

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DEL PÉPTIDO CIB1R, DERIVADO DEL DOMINIO
CITOPLASMÁTICO DE NEPRILISINA, EN LA MIGRACIÓN DE
CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN A-549**

POR

CARLOS ALEJANDRO MARTÍNEZ ARMENTA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOBIOLOGÍA**

MARZO, 2017

EVALUACIÓN DEL PÉPTIDO CIB1R, DERIVADO DEL DOMINIO
CITOPLASMÁTICO DE NEPRILISINA, EN LA MIGRACIÓN DE
CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN A-549

Comité de Tesis

Dr. Reyes Tamez Guerra
Director Interno

Dr. Javier Vargas Villarreal
Director Externo

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dra. Adriana Sampayo Reyes
Vocal

Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León
Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal

EVALUACIÓN DEL PÉPTIDO CIB1R, DERIVADO DEL DOMINIO
CITOPLASMÁTICO DE NEPRILISINA, EN LA MIGRACIÓN DE
CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN A-549

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN:

El Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Reyes Tamez Guerra.

La División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey N.L., bajo la dirección del Dr. Javier Vargas Villarreal.

Dr. Reyes Tamez Guerra
Director Interno

Dr. Javier Vargas Villarreal
Director Externo

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Cáncer de pulmón: epidemiología y aspectos generales	2
2.2 Ascitis maligna: microambiente tumoral que modula la progresión del cáncer	3
2.2.1 Reportes del efecto de la ascitis maligna en el control del cáncer	4
2.2.2 Reportes del efecto inductor del desarrollo tumoral	6
2.3 Péptido CIB1R: origen y características	8
2.4 Generalidades de la proteína Neprilisina	10
2.5 Neprilisina y su función en cáncer	11
2.6 Mecanismos de acción de la proteína Neprilisina	15
2.7 Péptidos antitumorales derivados de dominios proteicos	18
2.7.1 Muerte celular	19
2.7.2 Migración e invasión de células tumorales y endoteliales	20
2.8 Mecanismo de captura peptídica	23
2.8.1 Translocación directa	23
2.8.1.1 Poros transitorios	23
2.8.1.2 Micela invertida	23
2.8.1.3 Modelo Carpet	24
2.8.2 Endocitosis	25
2.8.2.1 Macropinocitosis	25
2.8.2.2 Endocitosis mediada por clatrin y caveolas	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 General:	28
5.2 Específicos:	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 Estrategia experimental	29
6.2 Metodología	30
6.2.1. Resuspensión de péptidos	30
6.2.2. Cultivo Celular	30
6.2.3. Viabilidad celular	31
6.2.3.1 Ensayo Azul alamar	31
6.2.4. Análisis del efecto <i>in vitro</i> en la migración celular	32
6.2.5. Ensayo de invasión de celular	33
6.2.6. Inhibición de la adhesión celular	35

6.2.7. Evaluación de la captura peptídica	35
6.2.7.1 Análisis de captación mediante citometría de flujo	35
6.2.7.2 Análisis fluorométrico mediante microscopía confocal	36
6.2.7.2 Inhibidores metabólicos	36
6.2.8. Ensayo de permeabilidad de membranas (captación de IP)	36
6.2.9. Análisis estadístico	37
7. RESULTADOS.....	38
7.1 Diseños tridimensionales y características físico-químicas de las secuencias peptídicas.	38
7.2 Efecto del péptido CIB1R en la viabilidad celular.	39
7.3 Inhibición de la migración celular ejercida por CIB1R.....	42
7.4 El péptido CIB1R inhibe la invasión celular	45
7.5 Efecto de CIB1R en la adhesión celular	48
7.6 Cinética de internalización peptídica.....	49
7.7 Distribución celular de la captura peptídica	52
7.8 Evaluación de la permeabilidad de la membrana celular.....	54
7.9 Captura peptídica con inhibidores metabólicos	55
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES.....	64
10. PERSPECTIVAS	65
11. BIBLIOGRAFÍA.....	66
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	80

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría.

Deseo agradecer al Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas por todo el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado en su programa de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.

Un especial agradecimiento al Centro de Investigación Biomédica del Noreste por aceptarme como parte del grupo de investigación durante mi formación de posgrado y por todas las facilidades otorgadas para culminar el proyecto de tesis.

Al Dr. Reyes Tamez Guerra y Dra. Rebeca Palacios Corona por la confianza que depositaron en mi para realizar este proyecto de investigación. Por todos sus consejos y motivación para desarrollar y concluir exitosamente esta tesis.

Agradezco al Dr. Javier Vargas Villareal por sus consejos y ayuda brindada, siempre dispuesto a apoyarme en este proyecto. Le doy las gracias por incitarme constantemente a dar lo mejor de mi intelectual y académicamente.

A mi comité tutorial: Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dra. Adriana Sampayo, Dr. Mario Bermúdez y Dr. Edgar Mendoza por todos sus consejos, recomendaciones, tiempo y ayuda durante estos dos años.

Al Dr. Arturo Chávez Reyes por permitirme realizar una estancia en su laboratorio en CINVESTAV - Unidad Monterrey y por sus valiosos aportes y críticas a esta tesis. Siempre al pendiente de mi avance y formación durante estos dos años. Agradezco profundamente sus observaciones y consejos brindados en cada reunión realizada, así como en las sesiones de seminarios de todos los jueves.

Agradezco infinitamente al Dr. Jesús García-Foncillas por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio de Oncología Médica en el Instituto de Investigación

Sanitaria del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz en Madrid, España. Así mismo agradecer a las doctoras Arancha Cebrián y Marlid Ramos por permitirme ser parte de su proyecto de investigación durante mi estancia en España. A la Dra. Laura del Puerto por enseñarme el funcionamiento de un bioterio de investigación para el desarrollo de modelos tumorales PDX.

A la Dra. Mónica Ramírez Cabrera por su apoyo y palabras de aliento cuando eran necesarias y por siempre estar al pendiente de mi avance. Agradezco infinitamente su ayuda al brindarme la línea celular 55x de fibroblastos de pulmón. A la QFB. Yuridia Torres Martínez por todo el apoyo brindado y buena predisposición.

A la Dra. Laura Zavala Flores y M.C. Sheila Villa Cedillo por su apoyo incondicional durante los ensayos realizados en el citómetro de flujo y por permitirme trabajar en su laboratorio cuando fue necesario.

A Martín, Héctor e Ivonne por sus enseñanzas y apoyo constante durante mi estancia en CINVESTAV. Siempre dispuestos a enseñarme técnicas de cultivo celular, biología molecular, uso del microscopio confocal y dejarme involucrar en sus modelos *in vivo*.

A Ofelia, Chuy, Magda, Fernando, Gabriel, Anail, Ana, Alain y Laura por el apoyo brindado durante mi estancia en el CIBIN - IMSS.

A mis compañeros del posgrado; Daniela, Leo, Zyanya, José Luis, Fernanda, Martín y Maricela por todos los momentos que pasamos durante estos dos años. A Marisol Guzmán y Melissa Esparza por su constante motivación para culminar este proyecto con éxito y por contar con su amistad desde hace más de 5 años.

A mi querida familia por el constante apoyo otorgado. A mis padres por su amor, enseñanzas, cuidado y por estar conmigo en todo momento. A mis dos hermanos, León Francisco y Alondra, por su invaluable apoyo, comprensión y cariño.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a los grandes pilares de mi vida.

Mis padres:

Carlos Martínez León

María de Jesús Armenta Rojas

Mis hermanos:

León Francisco Martínez Armenta

Alondra Guadalupe Martínez Armenta

Quienes siempre me han otorgado su incondicional apoyo y palabras de aliento, lo cual me ha fortalecido durante todos estos años lejos de casa.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nivel de expresión de NEP en diversos tipos de cáncer.....	11
Tabla 2. Características físico-químicas de las secuencias peptídicas.....	39
Tabla 3. Captación peptídica en las células A-549 tratadas con CIB1R, PS y PC.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los tipos histológicos de NSCLC diagnosticados en México.....	3
Figura 2. Localización del péptido CIB1R en la secuencia de Neprilisina.....	9
Figura 3. Estructura del transcrito de Neprilisina.....	10
Figura 4. Modelo de representación del efecto de la hipoxia y normoxia sobre el desarrollo del tumor.....	14
Figura 5. Mecanismo de acción de Neprilisina (NEP) en el proceso de apoptosis, migración y crecimiento celular.....	17
Figura 6. Regiones del dominio citoplasmático de NEP y relación con el péptido CIB1R.	18
Figura 7. Diagrama de la estrategia experimental implementada.....	29
Figura 8 Representación del sistema de migración celular.....	33
Figura 9. Representación del sistema de invasión celular.....	34
Figura 10 Estructuras tridimensionales de las secuencias peptídicas.....	38
Figura 11. Efecto de la viabilidad de los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT en la línea celular A-549.	40
Figura 12. Efecto de la viabilidad de los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT en la línea celular 55x.	41
Figura 13. CIB1R inhibe la migración de las células A-549.....	43
Figura 14. Gráfica dosis – respuesta de la inhibición de la migración celular.....	44
Figura 15. Efecto de los péptidos PS y PC en la migración celular.....	45
Figura 16. Estandarización del ensayo de invasión celular.....	46
Figura 17. Los péptidos CIB1R, CTT, PS y PC inhiben la invasión celular.....	47
Figura 18. Inhibición de la adhesión celular.....	48
Figura 19. Cinética de internalización peptídica en las células A-549.....	50
Figura 20. Índice de internalización de los péptidos CIB1R, PS y PC en las células A-549.	51
Figura 21. Distribución celular de los péptidos CIB1R, PS y PC internalizados.....	53
Figura 22. Histogramas representativos de la captura de IP.....	54
Figura 23. Inhibición de la captación de CIB1R, PS y PC en las células A-549.....	56

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATCC	American type cell culture
ATP	Adenosina trifosfato
CD	De las siglas en inglés, <i>Cluster of differentiation</i>
CO₂	Dióxido de carbono
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Horas
IC₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IP	Yoduro de propidio
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinasa de matriz
nm	Nanómetro
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógenos
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius

RESUMEN

Introducción: CIB1R es un péptido que deriva del dominio citoplasmático de la proteína Neprilisina, el cual se ha demostrado que regula el proceso de migración celular mediante su interacción con PTEN y Lyn-P. Se ha demostrado que diversos tipos de cáncer como el de pulmón, mama, próstata y ovario disminuyen la expresión de la proteína Neprilisina, lo cual incrementa las propiedades de invasividad de las células.

Métodos: Se evaluó la capacidad citotóxica del péptido CIB1R en las células A-549 mediante el ensayo de azul alamar y el efecto en la migración e invasión celular implementando cámaras de Boyden. La capacidad de internalización del péptido se demostró mediante citometría de flujo en 4 tiempos de incubación; 1, 3, 6 y 24 h. Mediante microscopía confocal se determinó la homogeneidad de la internalización del péptido a las 6 h.

Resultados: CIB1R, un péptido catiónico con la secuencia PKPKKKQ, se internalizó en el 98% de las células A-549 tratadas con la dosis 306 μ M después de 1 h de incubación. CIB1R también inhibió la motilidad celular en más de un 50% después de 24 h de tratamiento sin mostrar alteración en la viabilidad celular.

Conclusión: Se demostró la capacidad del péptido CIB1R de ser internalizado por las células de cáncer de pulmón A-549, induciendo una inhibición del proceso de migración e invasión celular dependiente de la dosis sin afectar su proliferación celular.

ABSTRACT

Introduction: CIB1R, a Neprilysin cytoplasmic domain-derived peptide, which has been demonstrated to regulate cell migration through interaction with PTEN and Lyn-P. However, the expression of Neprilysin is down regulated in lung, breast, prostate and ovarian cancer, which increase the invasiveness properties of cancer cells.

Methods: cytotoxic capacity of CIB1R was evaluated by alamar blue test. Migration and invasion assays were used to study the migratory response of lung cancer cells to CIB1R peptide. CIB1R-internalization capacity was demonstrated by flow cytometry at 1, 3, 6 and 24 h of incubation. Through confocal microscopy was analyzed the homogeneity of peptide internalization at 6 h.

Results: CIB1R, a cationic peptide (PKPKKKQ), internalized in 98% of lung cancer cells A-549 treated at dose 306 μ M after 1 hour of incubation. Over 50% of cell migration and invasion was inhibited after 24 h in presence of CIB1R. CIB1R was not toxic; cell viability did not decrease even at elevated concentrations.

Conclusion: our data support the ability of CIB1R to internalize and decrease the motility of A-549 human lung cancer cells in a dose-dependent manner, without affecting cell proliferation.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una patología que se caracteriza por la multiplicación descontrolada de una célula, la cual posee la capacidad de invadir tejidos adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso al cual se le denomina metástasis (OMS, 2015).

Ante los constantes avances del conocimiento de los efectos que el microambiente tiene sobre el desarrollo del cáncer, los líquidos producidos por los tumores se ha convertido en objeto de estudio por ser el sitio bioactivo para la mayoría de los factores de crecimiento, interleucinas, quimiocinas, fragmentos de la matriz extracelular (MEC) y otras proteínas, permitiendo comprender así la biología del tumor y desarrollar futuros tratamientos dirigidos hacia los diferentes mecanismos celulares que afecten la progresión de las células tumorales (Wiig y Swartz 2012; Matte et al. 2012).

En años recientes la elucidación de la composición proteómica de bajo peso molecular del líquido de ascitis maligno se ha convertido en una importante herramienta para elucidar posibles biomarcadores de diversas neoplasias. Así mismo, el líquido de ascitis maligna representa una invaluable fuente de biomoléculas, las cuales dependiendo de su naturaleza, pueden participar en la inhibición o promoción de los procesos de crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis.

Diversos grupos de investigación han demostrado que el líquido de ascitis maligno posee moléculas solubles capaces de inhibir la migración e invasión de células tumorales (metástasis) y HUVEC (angiogénesis), así como un efecto dual al inhibir y promover la apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer (Richardson et al. 2002; Jandu et al. 2006; Goncharenko et al. 2012). Así mismo, se ha demostrado que péptidos presentes en otros tipos de fluidos biológicos como la saliva son capaces de inducir muerte celular en líneas cáncer de colon y próstata (da Costa et al. 2015).

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer de pulmón: epidemiología y aspectos generales

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Se ha pronosticado que el número de muertes por esta patología seguirá creciendo, con una estimación de 11.5 millones de muertes en el año 2030 (Matters y Loncar 2006).

En México, el cáncer es la tercer causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2015). Datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía muestran que en nuestro país el cáncer es el causante del 12% del total de las defunciones registradas en el año 2015; siendo en hombres, el cáncer de próstata y de pulmón las principales causas de muerte por neoplasia maligna, y en mujeres es el cáncer de mama seguido por el cáncer cervicouterino (INEGI 2015).

Diversos reportes demuestran que el cáncer de pulmón es el principal tipo de malignidad diagnosticado a nivel mundial y representa la principal causa de muerte en hombres y mujeres por malignidades en latinoamérica (Arrieta et al. 2013; Torre et al. 2015; Ruchalski et al. 2016).

El cáncer de pulmón es clasificado en 2 principales categorías en base al tipo de célula que da origen al tumor: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas (Petersen y Warth 2016). Este último representa el subtipo de cáncer de pulmón más agresivo, característico en pacientes con antecedentes de tabaquismo intenso (Amini et al. 2014; Veronesi et al. 2015).

En base a datos publicados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) representa el 76% de todos los tipos de cáncer de pulmón en México, siendo el adenocarcinoma el principal subtipo de NSCLC diagnosticado, como se observa en la figura 1 (INCAN 2016).

Cáncer de pulmón de células no pequeñas

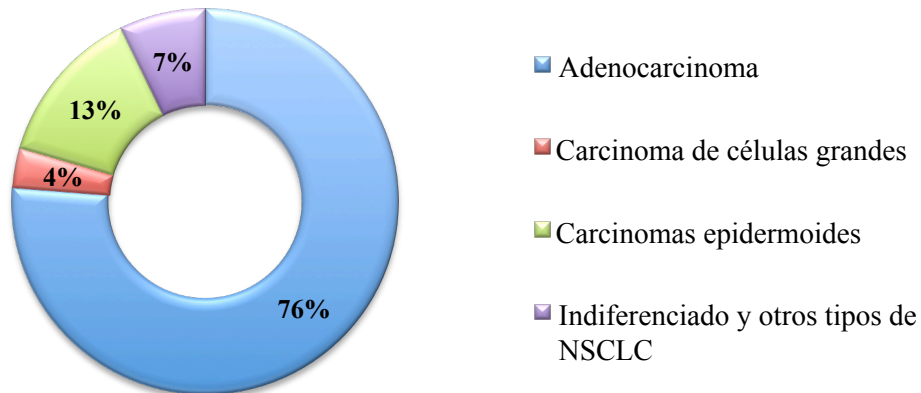


Figura 1. Distribución de los tipos histológicos de NSCLC diagnosticados en México.

Una de las complicaciones que presenta el cáncer de pulmón, así como el de mama, colon y ovario es el elevado índice de producción de ascitis maligna (AM). La AM se refiere a una acumulación en la cavidad peritoneal de fluido que contiene células cancerosas y esta representa el 10% de todos los casos de ascitis (Saif et al. 2009). Se ha reportado el desarrollo de AM hasta en un 54% de los pacientes oncológicos y un 20% de estos casos corresponden a pacientes que poseen un tumor primario no diagnosticado (Ammouri y Prommer 2010; Cavazzoni et al. 2013). Es por ello que la presencia de AM se asocia a un índice de morbilidad alto para el paciente.

2.2 Ascitis maligna: microambiente tumoral que modula la progresión del cáncer

La ascitis maligna indica la presencia de células tumorales en el fluido formado en la cavidad peritoneal de pacientes con metástasis debido al incremento de la filtración de fluidos, neovascularización y obstrucción linfática, lo cual representa un mal pronóstico para los pacientes (Kosanam et al. 2011).

Existen reportes de diversos tumores primarios que inducen la formación del líquido de AM en la cavidad peritoneal entre los cuales se encuentran, cáncer de ovario, próstata, colorrectal, gástrico, pancreático, uterino, de mama, pulmón y linfoma (Sangisetty y Miner 2012; Kipps et al. 2013).

En recientes investigaciones se ha reportado la presencia de moléculas biológicamente activas en el líquido de AM, las cuales son producidas por las células tumorales, macrófagos, linfocitos y fibroblastos del estroma que conforman el tumor. La naturaleza de estas biomoléculas confieren a la AM un microambiente que propicia el desarrollo del cáncer, sin embargo se cuentan con reportes que mencionan la existencia de factores presentes en este líquido con capacidad de regular la progresión tumoral (Palacios-Corona et al. 1999; Yang et al. 2005; Liao et al. 2011; Goncharenko-Khaider et al. 2012; Mikula et al. 2016).

2.2.1 Reportes del efecto de la ascitis maligna en el control del cáncer

Uno de los primeros estudios del efecto antitumoral de la ascitis fue su capacidad de inhibir la neovascularización del tumor (angiogénesis). En el año 2002, Richardson y su grupo de trabajo reportaron que, en fluidos de AM proveniente de pacientes con cáncer de ovario y gástrico, existe la presencia de angiostatina, un factor inhibidor de la angiogénesis, así como la confirmación de la presencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), molécula inductora de la angiogénesis. La evaluación del efecto angiogénico fue realizado mediante el ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM), resultando en una disminución significativa del 35% de la capilaridad formada respecto al control no tratado (Richardson et al. 2002). Estos datos son confirmados dos años más tarde por Rotenberg y colaboradores, quienes demostraron la presencia elevada de la proteína antiangiogénica, endostatina, en muestras de AM y efusión pleural de pacientes con cáncer de ovario, mama, pulmón, tracto urotelial y mesotelioma, comparadas con muestras de suero de pacientes oncológicos y sanos (Rotenberg et al. 2004).

Similarmente se observó una actividad antiangiogénica en el ensayo CAM de muestras de líquidos ascíticos malignos obtenidos de conejos Nueva Zelanda portadores de tumores VX2 en los pulmones. Dichas muestras contenían altos niveles de angiostatina, la cual se sabe que es un potente inhibidor de la angiogénesis. Sin embargo, este efecto se mantuvo en las muestras libres de angiostatina, las cuales fueron purificadas y un

segundo factor antiangiogénico fue aislado e identificado como un producto de degradación de la fibrina (FDP) (Hatton et al. 2002, 2004).

Jandu y colaboradores (2006) reportan la presencia de una mezcla de productos solubles de degradación de la fibrina con un peso molecular mayor a 200 kDa en el fluido de AM de cáncer de ovario humano. La evaluación del efecto antiangiogénico se determinó mediante el ensayo CAM y se observó una reducción significativa del 90% a un 47% del área de capilaridad coriónica, y la densidad capilar del 60% a un 26% en los grupos tratados. Los autores proponen que el mecanismo por el cual los FDP ejercen un efecto antiangiogénico no es del todo claro, sin embargo mencionan que es posible que estos FDP puedan asociarse con los factores de crecimiento, receptores del VEGF o con integrinas interfiriendo con la respuesta proangiogénica (Jandu et al. 2006).

Existen reportes del papel de la AM en la migración celular, en un estudio realizado por Puiffe y col., se caracterizó el efecto ejercido por los líquidos ascíticos en la expresión de genes relacionados con la invasión tumoral en un modelo *in vitro* de cáncer de ovario. En el estudio se demostró que las células OV-90 sobreexpresaron los genes TRIB1, MKP1, RGS4 y PLEC1 relacionados con el control del proceso de invasión y migración celular. Sin embargo, también se encontró una alta expresión de los genes MOSPD1 y ISGF3G, los cuales están involucrados con la progresión celular (Puiffe et al. 2007). En el año 2010, se demostró la inhibición de la migración celular de la línea de cáncer de ovario OV-90 al ser expuesta con AM. El 25% de las muestras analizadas de AM de pacientes con cáncer de ovario, presentaron un grado de inhibición variable de la motilidad celular que fluctuó desde un 20% a un 70% comparado con el control estimulado con SFB al 5% (Meunier et al. 2010). Lo anterior demuestra que la AM contiene factores solubles con capacidad de modular la migración celular.

Se ha demostrado el efecto de la AM en el proceso de apoptosis. En el año 2014 se reportó que el líquido de ascitis libre de células obtenido de pacientes con cáncer de ovario de alto grado de diferenciación, induce apoptosis por activación de la vía JNK y por la inducción de la expresión de los genes BRCA1, Fas y FasL, pero no por la

activación de la vía de caspasas en células de cáncer de ovario SKOV3. Lo anterior indica que el líquido ascítico sigue un mecanismo específico para inducir la muerte celular en esta línea de cáncer de ovario (Cohen et al. 2014). Estos hallazgos demuestran que la AM representa un microambiente rico en factores solubles que actúan modulando negativamente diversos mecanismos involucrados en la progresión del cáncer. Sin embargo, al ser la AM un microambiente propiciado por el tumor, existen en mayor concentración factores inductores de la progresión neoplásica.

2.2.2 Reportes del efecto inductor del desarrollo tumoral

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido encontrado en gran abundancia en muestras de AM (Zebrowski et al. 1999). Dicho factor juega un papel central en la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como neovascularización, lo cual confiere un elevado potencial metastásico para el tumor (Ahmed y Stevers 2013). Así mismo se ha reportado la presencia de otros factores en AM involucrados en la progresión tumoral, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés) el cual promueve significativamente la migración de las células tumorales y células mesoteliales del peritoneo humano (Sowter et al. 1999; Matsumoto y Nakamura 2006; Matte et al. 2014, 2015). El ácido lisofosfatídico (LPA) y dipeptidil peptidasa IV son otras moléculas encontradas en muestras de AM de pacientes con diversos tipos de neoplasias, los cuales fomentan la adhesión, migración e invasión de las células del tumor, fibroblastos y células estromales inmortalizadas (Kajiyama et al. 2002; Bian et al. 2004; Yamada et al. 2004).

Se ha demostrado que la AM es capaz de modular el proceso de apoptosis, diversos estudios han demostrado la presencia de factores solubles en muestras de AM de cáncer de ovario con capacidad de interactuar con la integrina $\alpha\text{v}\beta 5$ y subsecuente activación de Akt y FAK, promoviendo así, una regulación a la alta de c-FLIPs (inhibidor de caspasa-8) que otorga una protección de la apoptosis inducida por TRAIL en las células tumorales (Lane et al. 2007, 2010). En el año 2012, Goncharenko-Khaider y su grupo reportaron la inhibición de la apoptosis en células de cáncer de ovario CaOV3 estimuladas con AM. Las células CaOV3 presentaron una rápida activación de la

proteína ERK1/2 que está asociada con la regulación a la alta de Mcl-1, una proteína que atenúa la apoptosis inducida por TRAIL. Sin embargo, no se observó una sobreexpresión de otras proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-X_L (Goncharenko-Khaider et al. 2012).

Matte y colaboradores en 2012, reportaron el perfil de citocinas presente en el líquido de ascitis maligno de pacientes con cáncer de ovario, encontrando la presencia de angiogenina, angiopoyetina, molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1), interleucinas 6, 8 y 10, receptor de interleucina 6 (IL-6R), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), péptido de activación de neutrófilos-2 (NAP-2), osteoprotegerina (OPG), molécula quimiotáctica RANTES, inhibidor tisular de metaloproteinasa-2 (TIMP-2) y el receptor activador del plasminógeno de uroquinasa (uPAR), moléculas involucradas en procesos de inflamación, promoción e inhibición de la migración celular, angiogénesis y apoptosis, siendo estos de gran importancia para el desarrollo del tumor (Matte et al. 2012).

Por otra parte, Mikula-Pietrasik reportó que la composición bioquímica de la AM de los tumores de cáncer de ovario epitelial (EOC, por sus siglas en inglés) de tipo II, es responsable del nivel de agresividad y mortalidad que estos presentan. El autor encontró elevadas concentraciones de diversas quimiocinas y factores de crecimiento promotores del desarrollo tumoral (CCL2, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL12, HGF, PAI-1, TGF- β 1 y VEGF) en AM en comparación con la AM de EOC tipo I, el cual es de progresión lenta y genéticamente estable (Mikula-Pietrasik et al. 2016).

Recientemente, Mikula-Pietrasik y colaboradores demostraron un incremento del 55% en la migración celular de diversas líneas de cáncer de ovario tales como A2780, OVCAR-3 y SKOV-3; cuando eran expuestas a líquidos ascíticos malignos derivados de cáncer de ovario tipo II (no diferenciado), comparado con el efecto ejercido por ascitis benigna (control). También, se observó un mayor grado de proliferación celular con las muestras de AM (aproximadamente 49%). Ambos efectos se atribuyeron a las altas concentraciones de moléculas involucradas en la migración celular (CCL2, PAI-1 y

TGF- β 1) y mediadores de la proliferación celular (IL-6 y uPA) presentes en las muestras analizadas (Mikula-Pietrasik et al. 2016).

En nuestro grupo de investigación liderado por Palacios-Corona R., se ha evaluado el efecto inmunosupresivo mediante la cuantificación de la producción de óxido nítrico (NO) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) estimuladas con las fracciones <10 kDa de muestras de ascitis maligna y ascitis benigna. Como resultados preliminares, se ha encontrado que las muestras de ascitis maligna inducen una disminución en la producción de óxido nítrico en comparación a los controles benignos. Para elucidar las posibles moléculas peptídicas responsables de dicho efecto, se secuenciaron las fracciones <10 kDa mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS). La secuencia PKPKKKQ es una de las de mayor interés en este estudio, ya que alinea con la proteína Neprilisina, la cual se ha demostrado que es capaz de modular la migración y proliferación en diversos tipos de neoplasias (Palacios-Corona et al. 2017).

Los anteriores reportes abren el camino a la elucidación del efecto biológico que ejercen por sí mismas las moléculas presentes en el fluido ascítico maligno, ya que en base a la literatura anteriormente citada, la AM puede inducir un efecto dual en la angiogénesis, proliferación y migración celular.

2.3 Péptido CIB1R: origen y características

La secuencia PKPKKKQ, la cual denominamos CIB1R, fue identificado en las fracciones <10 kDa de muestras de ascitis y efusión pleural de pacientes con diversos tipos de neoplasias primarias.

La identidad de las secuencias encontradas en las fracciones <10 kDa fue realizada mediante estudios de espectrometría de masas, seguido de un análisis de identificación, asignación y validación con un 99% de confiabilidad realizado en el software bioinformático Trans-Proteomic Pipeline.

Se logró determinar que el péptido CIB1R es un buen candidato para su estudio después de haber realizado un análisis en donde se evaluaron las siguientes consideraciones para las proteína alineadas con las secuencias peptídicas encontradas en las fracciones <10 kDa:

- Función biológica de la proteína en cáncer
- Nivel de expresión
- Localización del péptido dentro de la secuencia proteica

El péptido CIB1R deriva del extremo amino terminal de la proteína Neprilisina. Dicho péptido se conforma de una secuencia de 7 aminoácidos (PKPKKKQ) abarcando un 26% de la secuencia total del dominio citoplasmático de la proteína. Posee un carga neta de +4 (catiónico) con un punto isoelectrico de 11.1 y un peso molecular de 853 Da.

En la figura 1 se esquematiza la ubicación de la secuencia del péptido CIB1R dentro del dominio citoplasmático de la proteína Neprilisina, la actividad relacionada en cáncer de cada uno de los dominios, así como un modelo tridimensional del péptido.

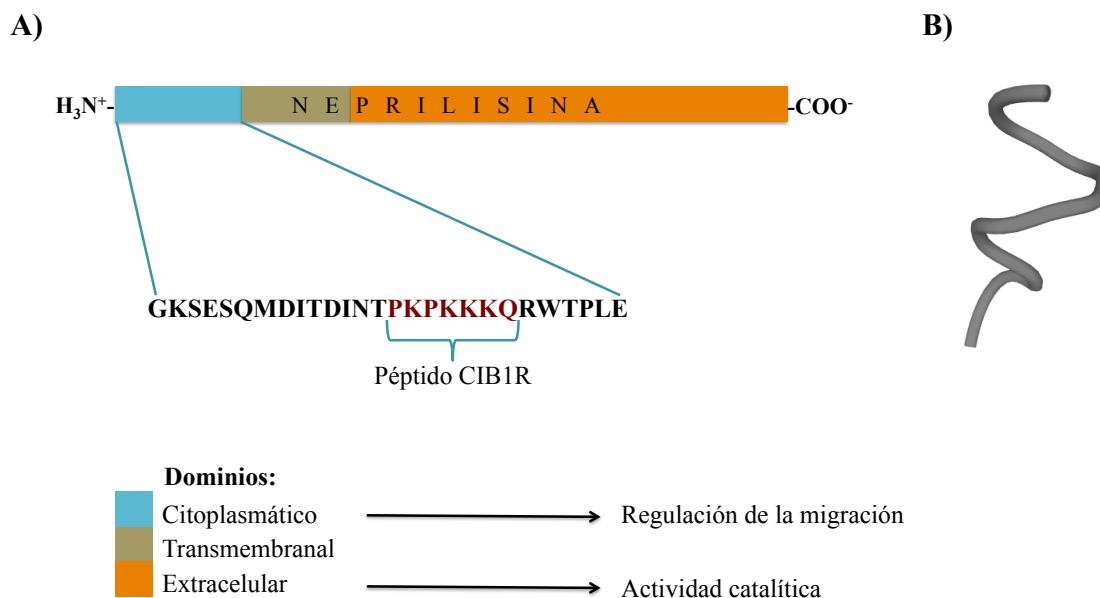


Figura 2. Localización del péptido CIB1R en la secuencia de Neprilisina. A) Secuencia de CIB1R dentro del dominio citoplasmático de Neprilisina. B) Modelo tridimensional del péptido CIB1R generado en la plataforma bioinformática PEP-FOLD Peptide Structure Prediction Server. Abreviaturas: H_3N^+ , amino terminal; $-COO^-$, carboxilo terminal.

2.4 Generalidades de la proteína Neprilisina

Neprilisina es una metaloproteinasa dependiente de zinc unida a la membrana celular, se le conoce como endopeptidasa neutral (NEP, por sus siglas en inglés), metaloproteinasa de membrana (MME), EC 3.4.24.11, arteriopeptidasa, CD10 y/o antígeno de leucemia linfoblástica aguda (CALLA) (Gayathiri et al. 2014).

Se han identificado 4 secuencias de la proteína NEP de 90-110 kDa, esto como resultado del procesamiento alternativo, lo cual sugiere que la expresión del gen de NEP puede estar controlada diferencialmente de manera tejido específico (D'Adamio et al. 1989). De igual forma se ha determinado mediante estudios de mutagénesis sitio dirigida, el sitio activo involucrado en la actividad catalítica, el cual corresponde al residuo del ácido glutámico (E646) presente en el dominio extracelular y 2 sitios activos de histidina ($^{583}\text{HExxH}^{687}$) necesarios para la unión del cofactor Zinc (Fig. 3) (David et al. 1999; Oefner et al. 2000; Marie-Claire et al. 2000).



Figura 3. Estructura del transcrito de Neprilisina. Representación esquemática de la secuencia primaria de NEP, la cual posee un dominio citoplasmático en el extremo amino terminal de 27 aa's denominado DIC que induce señalización, una secuencia corta de 22 residuos hidrofóbicos que forman un DTM y un DEC de 700 residuos que contiene el motivo (HExxH, histidina y ácido glutámico) representado por un rectángulo de color negro. Residuos de cisteína son identificados por (•), la histidina H711, la cual es responsable de la estabilización del estado de transición se representa con (■) y el glutamato catalítico E646 con un (▲). Abreviaturas: DIC, dominio intracelular; DTM, dominio transmembranal; DEC, dominio extra celular; H_3N^+ , amino terminal; $-\text{COO}^-$, carboxilo terminal.

La proteína NEP normalmente se expresa en una gran variedad de tejidos, incluyendo células epiteliales de la próstata, riñón, mama, intestino, colon, hígado, endometrio, glándula adrenal, pulmón, en neutrófilos y fibroblastos. Su función es controlar el crecimiento y diferenciación mediante la modulación de la actividad de diversos péptidos bioactivos circulantes a nivel sistémico, entre los cuales se pueden mencionar el

péptido natriurético atrial, sustancia P, bradiquinina, oxitocina, Leu- y Met-encefalinas, neurotensina, bombesina, endotelina-1 y β -amiloide (Metzgar et al. 1981; Imai et al. 1992; Sato et al. 1996; Goodman et al. 2006).

Se ha documentado la pérdida o disminución de la expresión de NEP en una gran variedad de malignidades, incluyendo cáncer renal, de mama, de próstata, de vejiga, adenocarcinoma de estómago y colon débilmente diferenciado y en cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, resultando en una alta acumulación de péptidos bioactivos que facilitarán la progresión y transformación neoplásica (Shipp et al. 1991; Sato et al. 1996; Göhring et al. 1998; Nanus 2003; Varona et al. 2010).

2.5 Neprilisina y su función en cáncer

La función exacta de Neprilisina en la proliferación tumoral y resistencia terapéutica a la fecha no ha sido completamente esclarecida, ya que la proteína posee diversos efectos en base al tipo de malignidad, grado de diferenciación del tumor y niveles de expresión, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Nivel de expresión de NEP en diversos tipos de cáncer.

Cáncer	Nivel de expresión	Propiedad	Referencia
Melanoma	Alta expresión	Mayor grado de angiogénesis, metástasis y proliferación.	Kanitakis et al. 2002. Bilakovic et al. 2004. Oba et al. 2016.
Cáncer de tiroides papilar-folicular	Alta expresión	Representa un mal pronóstico para el paciente.	Tomoda et al. 2003.
Cáncer de tiroides papilar	Alta expresión	Estadio avanzado.	Mokhtari et al. 2014.
Carcinoma de células escamosas (cabeza y cuello).	Expresión incrementada	Le otorga resistencia terapéutica.	Bilakovic et al. 2004.
Cáncer colorrectal	Expresión incrementada	Mayor capacidad invasora cuando es un tumor altamente diferenciado. Favorece la metástasis a hígado por	Kuniyasu et al. 2010. Jang et al. 2013. Sasaki et al. 2014. Mizerska-Kowalska et

		degradación de met-enkefalina.	al. 2016.
Cáncer de próstata	Disminución o pérdida total de la expresión	Progresión independiente de andrógeno: migración y proliferación celular. Se asocia a un fenotipo agresivo y alto índice de malignidad (metástasis).	Papandreou et al. 1998. Dai et al. 2001. Freedland et al. 2003. Osman et al. 2006. Dall'Era et al. 2007. Fleischmann et al. 2011.
Carcinoma cervical	Expresión disminuida	Un mayor grado de proliferación e invasión celular.	Terauchi et al. 2005.
Cáncer renal	Disminución en la expresión	Favorece el crecimiento y migración celular.	Göhring et al. 1998. Varona et al. 2010.
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Disminución y pérdida de la expresión	Aumento en el crecimiento tumoral. La hipoxia favorece la disminución de NEP en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Carpenter y Stenmark 2001. Gürel et al. 2012. Leithner et al. 2014.
Cáncer de pulmón de células pequeñas	Expresión disminuida	Desarrollo tumoral se ve favorecido.	Shipp et al. 1991. Myong 2002.
Cáncer de mama	Expresión disminuida	Mayor grado de invasividad celular.	Smollich et al. 2007. Stephen et al. 2016.
Cáncer de ovario	Expresión incrementada	Suprime el potencial progresivo de manera <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Kajiyama et al. 2005.

En un estudio realizado con muestras clínicas de tumor primario de NSCLC y líneas celulares del mismo tipo de cáncer de pulmón, se reportó que la expresión de NEP está inversamente correlacionada con la proliferación celular (Ganju et al. 1994). Lo anterior se confirmó años después con lo reportado por Tokuhara en su investigación, quien sugiere que la expresión del gen de NEP puede ser usada como un indicador de pronóstico en NSCLC, ya que la sobrevivencia de los pacientes que expresan el gen es mayor comparada con aquellos que poseen un tumor que no lo expresa (Tokuhara et al. 2001).

Posteriormente, en el año 2002 se reportó la pérdida de la expresión de la proteína NEP en un 76% del total de las muestras clínicas analizadas de NSCLC y en un 80% de las

muestras de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), mientras en los fibroblastos del estroma, epitelio alveolar y bronquial se reveló una alta expresión (Myong 2002). Esto sugiere que Neprilisina juega un papel importante en la carcinogénesis pulmonar. Simultáneamente, Kristiansen y su grupo realizó un estudio cuyo objetivo fue demostrar la existencia de una asociación entre la expresión de NEP en muestras de NSCLC con parámetros clínico-patológicos y supervivencia de los paciente. De un total de 114 muestras de NSCLC analizadas por inmunohistoquímica empleando la técnica de microarray de tejidos (TMA, por sus siglas en inglés), se observó la expresión de NEP solamente en un 19% de los casos sin mostrar alguna asociación significativa con la sub-clasificación del tumor, tamaño, etapa clínica y tiempo de supervivencia del paciente (Kristiansen et al. 2002).

Gürel y grupo de trabajo (2012), estudiaron los niveles de expresión de NEP en el epitelio y estroma de muestras de NSCLC, así como su relación con la supervivencia de los pacientes. Se analizaron un total de 66 muestras patológicas de NSCLC mediante inmunohistoquímica, obteniendo como resultado una baja expresión de NEP en las células epiteliales y una alta expresión en el estroma. Al comparar las características clinicopatológicas con la expresión de NEP, encontraron que la elevada señalización de la proteína en el estroma estaba asociada con la recurrencia del cáncer y disminución de la supervivencia. En contraste a lo anterior, la expresión de NEP en las células epiteliales fue asociada con un incremento en la supervivencia de los pacientes. Esto demostró que la expresión de NEP en distintos componentes celulares del NSCLC posee efectos opuestos en el microambiente del tumor (Gürel et al. 2012).

La hipoxia es otro factor que se ha demostrado que influye en la regulación negativa de la expresión de NEP en células de cáncer de pulmón (NSCLC), próstata y en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). El factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α , por sus siglas en inglés), es la proteína encargada de mediar este efecto al unirse a los elementos de respuesta hipóxica presentes río arriba del promotor de Neprilisina (Carpenter y Stenmark 2001; Mitra et al. 2013; Leithner et al 2014). La disminución en la expresión de NEP promueve no solo el crecimiento de las células de

cáncer, sino también crea un microambiente favorable para la angiogénesis mediada por hipoxia, como se muestra en la figura 4 (Mitra et al. 2013).

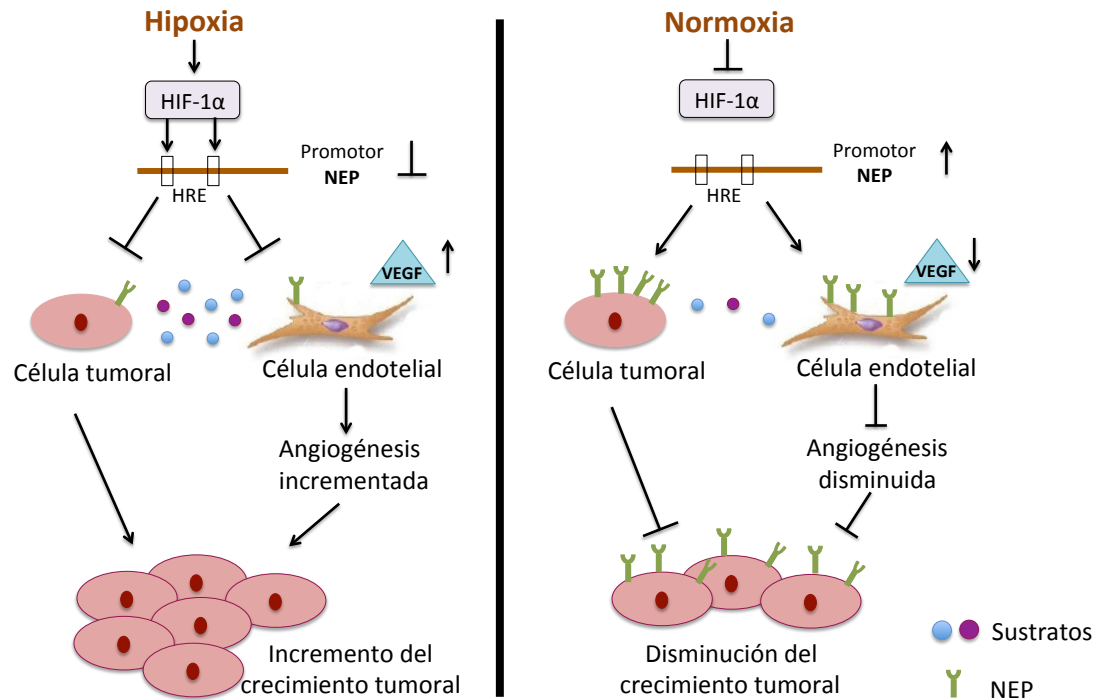


Figura 4. Modelo de representación del efecto de la hipoxia y normoxia sobre el desarrollo del tumor. Hipoxia: disminución de la expresión de NEP por efecto de HIF-1 α conllevando a un aumento en el crecimiento tumoral. Normoxia: HIF-1 α no presenta efecto sobre el promotor de NEP, por lo cual no regula su expresión. Abreviaturas: HRE, elemento de respuesta hipóxica; VEGF; factor de crecimiento endotelial vascular.

Varios estudios han evaluado el comportamiento de la expresión de NEP en cáncer de mama y su correlación con el pronóstico de supervivencia. En un estudio de 600 muestras de pacientes con cáncer de mama invasivo, demostraron la existencia de una correlación entre la expresión de NEP con una mayor supervivencia y menor grado de metástasis. El porcentaje de metástasis que se presentó fue del 36.2% y 60% en aquellas pacientes que eran NEP+ y NEP-, respectivamente. A pesar de ello, se encontró que el grado de expresión de la proteína disminuía con la progresión maligna del cáncer de mama (Smollich et al. 2007).

Recientemente, se ha reportado una supresión en la expresión de NEP en muestras clínicas de carcinoma ductal invasivo y en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 como modelos *in vitro* de cáncer de mama. Los niveles de expresión de los tejidos de cáncer mamario y de las células de cáncer de mama se compararon con el índice de NEP expresada en tejido normal y en células epiteliales normales, respectivamente. La expresión de la proteína fue analizada mediante RT-PCR y citometría de flujo. Así mismo, se demostró que la regulación a la baja en la expresión de la proteína es causada por un alto grado de metilación de su promotor, lo cual fue evaluado mediante el ensayo de conversión de bisulfito (Stephen et al. 2016).

Diversos grupos han documentado la existencia de hipermetilación del promotor de NEP en muestras patológicas de cáncer de próstata en etapa temprana que presentan bajos niveles de expresión, lo cual también se ha demostrado en tumores no sólidos (malignidades linfoides), sugiriendo que este fenómeno es el responsable del silenciamiento de Neprilisina (Osman et al. 2004; Taylor et al. 2006).

Los diversos efectos que presenta la proteína NEP en cáncer, se debe al mecanismo dual que desempeña para el control de la progresión neoplásica. Uno de ellos como ya se mencionó es inducir degradación de péptidos bioactivos en el espacio extracelular, por otra parte se ha demostrado que es capaz de regular el proceso de migración celular independientemente de su actividad catalítica.

2.6 Mecanismos de acción de la proteína Neprilisina

Neprilisina es conocida por comportarse como un supresor tumoral por inhibir distintos eventos que contribuyen a la progresión neoplásica. NEP inactiva catalíticamente una gran variedad de péptidos de no más de 30 aminoácidos mediante escisión del enlace peptídico del extremo amino terminal adyacente a residuos hidrofóbicos. Bombesina, representa un sustrato para NEP, la cual induce la señalización de FAK al unirse al receptor acoplado a proteína G y culminar en la promoción de la división celular e inhibición de la apoptosis (Zheng et al. 2006). Igualmente, NEP degrada factores de crecimiento como el FGF2 que al unirse a su receptor, FGF2R, induce la señalización

mediada por Akt promoviendo el crecimiento celular endotelial y angiogénesis (Goodman et al. 2006).

Adicionalmente a la capacidad que posee NEP para regular la acción biológica de varios péptidos mediante disminución de su concentración extracelular disponible para unirse al receptor, puede regular directamente la etiopatogénesis tumoral a través de distintas vías de señalización del crecimiento, migración celular y apoptosis.

Actualmente se cuentan con reportes donde se demuestra la capacidad de la proteína NEP para inhibir la migración celular independientemente de su actividad catalítica. Dicho efecto se lleva a cabo vía interacción proteína-proteína del dominio citoplasmático de NEP con la quinasa Lyn fosforilada, la cual posteriormente se une a la subunidad p85 de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) resultando en un complejo proteico Neprilisina-Lyn-PI3K. Este complejo bloquea competitivamente la interacción entre la quinasa de adhesión focal (FAK) y PI3K, inhibiendo la migración celular (Ganju et al. 1996; Sumitomo et al. 2000).

Por otra parte el dominio citoplasmático de Neprilisina (residuos 16 - 22) se asocia directamente con el supresor tumoral PTEN (residuos 380-385) a través de interacciones electroestáticas, otorgándole a este último una estabilidad prolongada y un incremento en la actividad fosfatasa, lo cual conlleva en una disminución de la fosforilación de la molécula de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), causando una regulación a la baja en la actividad de Akt (Sumitomo et al. 2004, 2005).

Para una mayor comprensión, los mecanismos de acción de la proteína Neprilisina previamente descritos se ejemplifican en la figura 5, haciendo énfasis en la señalización responsable de la regulación de la migración celular.

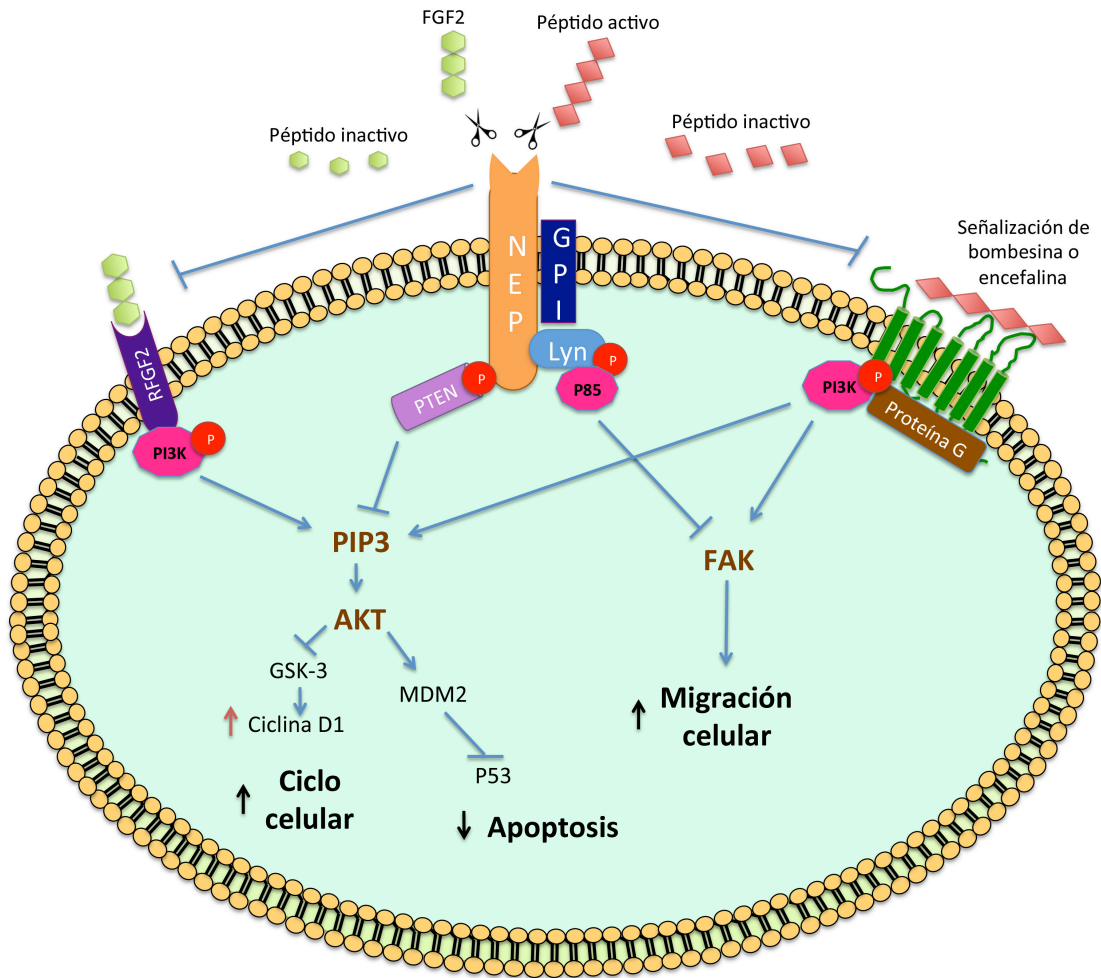


Figura 5. Mecanismo de acción de Neprilisina (NEP) en el proceso de apoptosis, migración y crecimiento celular. Abreviaturas: PIP3, Fosfatidilinositol trifosfato; FAK, Quinasa de adhesión focal; PI3-K, fosfatidilinositol 3 quinasa; GPI, glicosil fosfatidilinositol; Flechas negras, efecto inducido por bombesina y/o FGF2.

Como se mencionó anteriormente, el dominio citoplasmático es el responsable de ejercer una regulación de la migración celular. En base a lo reportado por Terawaki en el 2007, el dominio citoplasmático de la proteína se conforma de 3 regiones: la región polar N-terminal, una región anfipática y la región básica. Los dominios fueron establecidos mediante estudios de cristalografía de rayos X, determinación de estructuras y formación de complejos de NEP con proteínas reguladoras de la migración (Terawaki et al. 2007). La región básica antes mencionada, se caracteriza por contener en su secuencia los residuos Lys¹⁶, Lys¹⁸, Lys¹⁹, Lys²⁰ y Arg²², la cual presenta alta similaridad con la región básica de ICAM-2, molécula capaz de interactuar con PIP2 cargado negativamente e

inducir una regulación de la migración celular. Es por ello que Terawaki y colaboradores sugieren que NEP puede interactuar directamente con PIP2 y modular la migración celular.

Tomando en consideración lo anteriormente citado, se piensa que el péptido CIB1R puede modular el efecto de la migración celular, ya que su secuencia forma parte del dominio de la proteína responsable de bloquear la migración celular. Como se muestra en la figura 6, el péptido CIB1R contiene 6 de los 7 aminoácidos que conforman la región básica del dominio citoplasmático de Neprilisina.

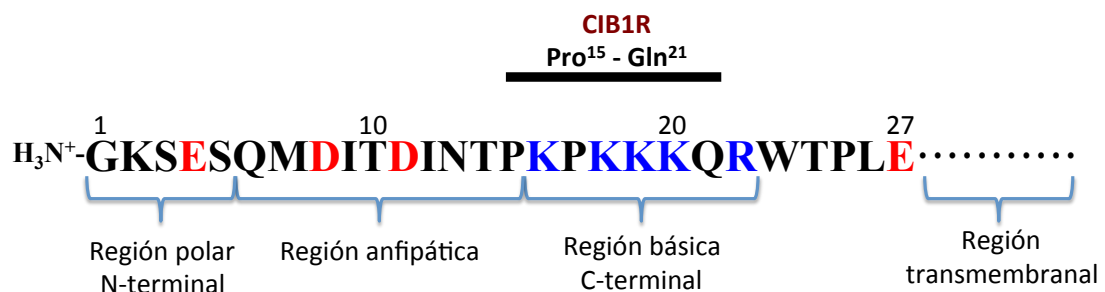


Figura 6. Regiones del dominio citoplasmático de NEP y relación con el péptido CIB1R. La secuencia del péptido CIB1R cubre un 85% de la región básica del dominio citoplasmático de NEP, la cual se ha demostrado ejerce un efecto en la migración celular. Se muestran en azul los aminoácidos básicos y en rojo los ácidos. Abreviaturas: C-terminal, carboxilo terminal; N-terminal y H₃N⁺, amino terminal; Pro¹⁵, residuo de prolina #15; Gln²¹, residuo de glutamina #21.

Actualmente se cuentan con reportes del efecto ejercido por péptidos derivados de los dominios activos de diversas proteínas humanas, generando un efecto que contribuya en el control del desarrollo del cáncer mediante la regulación de la angiogénesis, proliferación e invasión celular.

2.7 Péptidos antitumorales derivados de dominios proteicos

Diversos estudios se han realizado evaluando el potencial que presentan diversos péptidos diseñados a partir de sitios activos responsables de inducir una señalización que bloquee o induzca un efecto en la muerte celular y/o migración de células tumorales.

2.7.1 Muerte celular

Okumura y col., evaluaron péptidos derivados del dominio C-terminal de la proteína humana CAP18, la cual en condiciones normales contribuye en la defensa innata del huésped contra microorganismos invasores. El péptido hCAP18(109-135) indujo apoptosis independiente de caspasas en la línea SAS-H1 de carcinoma oral de células escamosas mediante despolarización de la mitocondria sin presentar este efecto en fibroblastos gingivales humanos (HGF) y en la línea HaCaT de queratinocitos humanos (Okamura et al. 2004).

En el año 2008, Xu y colaboradores reportaron el efecto del péptido alfa-defensina-1 (HNP1), el cual induce citotoxicidad en células tumorales, así como un efecto en la inhibición de la neovascularización e incremento en la infiltración linfocítica al tumor en un modelo xenográfico de cáncer de pulmón. Para analizar dicho efecto indujeron la expresión del péptido en la línea celular A-549, obteniendo una alta acumulación de HNP1 en el citoplasma e inducción de muerte celular por apoptosis (XU et al. 2008).

En un estudio realizado por Kawabata y grupo de trabajo, se demostró la asociación de 2 péptidos (C1B1; residuos 101-112 y C1B5; residuos 141-151) derivados del dominio C1B de la proteína quinasa C γ (PKC γ) con las isoenzimas PKC, en las cuales ejercieron una modulación de sus actividades involucradas en el desarrollo del cáncer de colon en modelos *in vitro* e *in vivo*. Ambos péptidos a concentraciones micromolares indujeron una atenuación del crecimiento tumoral entre un 60 y 70% en las líneas celulares Caco-2, COLO205 y SW620, sin embargo C1B5 fue el péptido que no presentó efecto citotóxico en células epiteliales sanas de colon. El tratamiento con los péptidos C1B1 y C1B5 atenuó la proliferación de la línea celular COLO205 mediante 2 mecanismos: arresto del ciclo celular en la fase G2 y estimulación de la apoptosis. En cuanto a los estudios *in vivo*, se observó una disminución del crecimiento del tumor en un 76% en el modelo xenográfico de la línea COLO250 tratado vía intratumoral con el péptido C1B5. Tomando en consideración todos estos resultados, el péptido C1B5 presenta un potencial efecto como agente quimioterapéutico en cáncer de colon, sin dañar los tejidos normales (Kawabata et al. 2012).

Se han identificado algunos péptidos secretados por el corazón que han mostrado propiedades anticancerígenas en modelos *in vivo* de adenocarcinoma pancreático, de mama y carcinoma de pulmón de células pequeñas reduciendo la viabilidad celular en un 80%, 66% y 86% respectivamente y en más de un 96% en ensayos *in vitro*. Las vías de señalización afectadas por los péptidos fueron WNT, JNK, STAT y la cascada de las quinasas RAS - MEK 1/2 - ERK 1/2, así mismo inhibieron a los proto-oncogenes c-FOS y c-JUN presentes en el núcleo de la célula (Veseli 2013).

Recientemente, da Costa reportó el efecto de péptidos presentes en la saliva humana contra líneas celulares de cáncer de mama (T47-D), próstata (PC-3), colon (HT-29), osteosarcoma (MG63) y de vejiga (T-24) los cuales reducen la proliferación celular, observándose un mayor efecto y dependiente de la dosis en la línea celular de cáncer de mama. La inducción de la muerte celular que presentaron los péptidos fue mediada por el proceso de apoptosis, ante una disminución de la expresión de Bcl-2 (da Costa et al. 2015).

Simultáneamente, en el año 2015, Kuroda y equipo de trabajo publicaron el efecto supresivo en cáncer de mama que presentan 4 secuencias peptídicas, las cuales poseen una secuencia de 5 aminoácidos y derivan de los sitios de autofosforilación del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés). Para facilitar la internalización del péptido al espacio citoplasmático de las células MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 y T47D, estos fueron conjugados con el péptido de penetración celular TAT. Cuando las líneas celulares fueron tratadas con las 4 secuencias peptídicas, la proliferación celular se vio afectada, ya que se ve suprimida la fosforilación del receptor de IGF-1 afectando las vías de señalización de MAPK y PI3K, las cuales regulan los procesos de proliferación y diferenciación (Kuroda et al. 2015).

2.7.2 Migración e invasión de células tumorales y endoteliales

Yi y colaboradores en el 2009, publicaron el efecto del péptido KV11, una secuencia de 11 aminoácidos derivado del dominio KV de la Apolipoproteína humana. KV11 inhibió el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo xenográfico de cáncer de mama a través de

la regulación de la migración celular y angiogénesis tumoral, ya que ejerció un bloqueo selectivo de la vía de señalización c-Src inducida por el VEGFR. En ensayos *in vitro*, el péptido KV11 inhibió la angiogénesis por la supresión de la migración y formación de red capilar de las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), sin afectar la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7 (Yi et al. 2009).

Hua y equipo de trabajo, evaluaron el efecto de una secuencia a la cual denominaron péptido inhibidor del crecimiento (GPI) en los procesos de migración, invasión y crecimiento de las células de cáncer de tiroides folicular WRO. GPI posee una secuencia de 34 aminoácidos aislados del tercer dominio de la proteína alfa-fetoproteína humana. Entre sus resultados reportan que no existen una inhibición de la proliferación celular en la línea WRO, sin embargo la migración e invasión celular se vieron inhibidas significativamente en un 33.3% y 67.1%, respectivamente cuando se trataron las células por 4 días a una dosis de 50 μ M (Hua et al. 2010).

Li y grupo de investigación, en el año 2014, demuestran que los péptidos myr-KRNRPPLEED y myr-KRVPPQEEQ derivados del dominio citoplasmático de las integrinas α_{IIb} y α_V , inhiben la adhesión de las líneas celular MDA-MB-435 y MCF-7 a vitronectina. Ambos péptidos se unen a β -tubulina conllevando a una reestructuración del citoesqueleto de las células, ante tal efecto las propiedades invasivas de las células de cáncer de mama se vieron disminuidas (Li et al. 2014).

Jeanne y colaboradores reportaron en su estudio la identificación de un péptido proveniente de la proteína CD47, llamado TAX2, el cual se une al extremo carboxilo terminal de Trombospondina-1 (TSP-1) para prevenir la interacción CD47:TSP-1. La administración *in vivo* de TAX2 alteró la vascularización del tumor de melanoma, induciendo una extensa necrosis y en modelos de carcinoma pancreático inhibió el crecimiento y vascularización en un alto grado (Jeanne et al. 2015).

En el año 2016, la investigación de Gallo-Oller reveló el efecto antitumoral que presenta P144, un péptido inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus

siglas en inglés) y el cual deriva del receptor del TGF- β . P144 disminuyó la migración e invasividad tanto *in vitro* e *in vivo*, acompañada de una reducción en la proliferación tumoral por la inducción de apoptosis. Como modelo de estudio se utilizaron las líneas celulares de glioblastoma A-172 y U-87MG. En base a sus descubrimientos, el autor sugiere que el potencial efecto presentado por el péptido se debe a la regulación transcripción del TGF- β (Gallo-Oller et al. 2016).

Así mismo, Choi y colaboradores publicaron el potencial ejercido por un péptido derivado del sitio de unión a heparina de la proteína morfogénica ósea 4 (BMP4, por sus siglas en inglés), al cual denominan péptido de unión a heparina (HBP). HBP posee la secuencia (RKKNPNCRRH) correspondiente a los residuos 15-24 de la proteína BMP4. Se demostró que las células HUVEC se vieron afectadas en su migración, invasión y formación de red capilar de manera *in vitro* al estar en contacto con el péptido o con medio condicionado obtenido de la línea celular MDA-MB231 de cáncer de mama tratada con el péptido. Debido a la habilidad del péptido para bloquear las interacciones entre los proteoglicanos y los factores de crecimiento que inducen la angiogénesis, se logró observar una disminución en la expresión de ERK, FAK, Akt, Metaloproteinasa de matriz 2 y 9 (Choi et al. 2016).

Como se mostró anteriormente, la investigación y desarrollo de péptidos que deriven de los dominios de proteínas involucradas en vías de señalización del cáncer, ha ido cobrando auge en los últimos años por sus potenciales efectos en la regulación de la evolución de las neoplasias malignas. Sin embargo, estos péptidos para poder ejercer una función en las células, tienen que lograr superar 2 aspectos importantes:

- Presentar baja degradación enzimática, en especial cuando son péptidos que actúan a nivel de membrana celular, mediante interacción con algún receptor.
- Lograr internalizar en las células. Si su efecto es a nivel citoplasmático, los péptidos deberán ser captados por la célula mediante algún mecanismo dependiente o independiente de energía.

2.8 Mecanismo de captura peptídica

El mecanismo de captación por el cual los péptidos internalizan al citoplasma dependerá de las características de cada péptido como la carga neta, hidrofobicidad y concentración. Así mismo, son importantes las características del sistema biológico en el que se evalúa; tipo de célula, parámetros fisiológicos, tiempo de incubación, entre otros. De manera general los mecanismos se clasifican en dos grupos; translocación directa (independiente de energía) y endocitosis (dependiente de energía) (Skotland et al. 2015; Kristensen et al. 2016).

2.8.1 Translocación directa

El modelo de translocación directa se divide en 3 mecanismos; formación de poros transitorios, micelas invertidas y modelo carpet.

2.8.1.1 Poros transitorios

El primer paso del mecanismo de poros transitorios es la interacción del péptido con carga positiva con los componentes de la membrana que poseen carga negativa, tal como los proteoglicanos de heparan-sulfato. Esto implica una desestabilización transitoria de la membrana asociada con un plegamiento del péptido que resultará en su inserción dentro de la membrana que le permitirá formar un poro transitorio como producto de la oligomerización. Este proceso es favorable cuando hay una concentración elevada del péptido y secuencias anfipáticas en estructura α -hélice que permita formar un modelo de barril, en donde los residuos hidrofóbicos interactúan con las cadenas alifáticas de los fosfolípidos presentes en la bicapa y los residuos hidrofílicos forman un poro central. (Madani et al. 2011; Kristensen et al. 2016). Otra versión de este modelo es la formación de “poros toroidal”, el cual es similar al anterior, excepto que en este modelo los péptidos insertados en la membrana interactúan exclusivamente con los grupos polares de los fosfolípidos de la membrana, induciendo un rearrreglo significativo de la bicapa lipídica.

2.8.1.2 Micela invertida

Este modelo fue propuesto inicialmente como el mecanismo por el cual el péptido pAntp se internalizaba en las células. Es una translocación independiente de receptor y el mecanismo inicia con la unión de los residuos cargados positivamente (lisinas y

argininas) con los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente, lo cual conduciría a una alteración de la bicapa lipídica, formando estructuras hexagonales invertidas (micelas invertidas). Los péptidos quedarían atrapados en el medio hidrofílico presente en el interior de la micela hasta que estos interactúen de nuevo con los componentes de la membrana y los conduzcan en un proceso inverso para su consiguiente liberación en el espacio intracelular (Derossi et al. 1996; Trabulo et al. 2010). Este modelo es sustentado con datos obtenidos mediante estudios de resonancia magnética nuclear, los cuales muestran que la interacción del péptido pAntp con las membranas puede resultar en la formación de estructuras invertidas (Berlose et al. 1996).

2.8.1.3 Modelo Carpet

De acuerdo a este modelo, la translocación de los péptidos por la membrana ocurrirá como una consecuencia de una desestabilización transitoria de la membrana celular, inducida por la extensa asociación de los péptidos a su superficie, y consecuentemente una reorganización de los fosfolípidos (Lundberg y Langel 2003; Skotland et al. 2015).

Aunque los modelos descritos anteriormente comparten varias características en común, es importante destacar algunas diferencias (Trabulo et al. 2010; Reissmann 2014; Raucher y Ryu 2015):

- i) De acuerdo al modelo de micelas invertidas, los péptidos permanecen asociados a la superficie de la membrana durante la translocación y nunca experimentan un contacto directo con el interior hidrofóbico de la bicapa lipídica, en contraste a lo descrito en el modelo de formación de poros, donde la inserción de los péptidos en la membrana y su conformación transmembranal son pasos importantes del proceso de translocación.
- ii) Tanto el modelo de “poro toroidal” y el “modelo carpet” describen una reorganización extensa de los fosfolípidos de la membrana, en contraste al modelo de barril, en el cual la estructura de la bicapa lipídica no es perturbada significativamente.
- iii) La interacción de los péptidos con las membranas celulares resultará en la formación de una superficie cóncava de acuerdo a el modelo de micelas

invertidas, mientras las superficies convexas serán formadas en el modelo de “poros toroidal”.

- iv) En los modelos que involucran la formación de poros de barril o “toroidal” ocurrirá la homo-oligomerización de los péptidos insertados en la membrana, lo que predice la existencia de una estructura bien definida, en contraste con la estructura altamente desorganizada responsable de la desestabilización de la membrana celular descrita en el “modelo carpet”.

2.8.2 Endocitosis

Esta vía se divide en diferentes mecanismos celulares responsables de la captación de biomoléculas. De manera general se puede dividir en dos principales categorías:

Fagocitosis; un proceso que ocurre solo en células especializadas, los macrófagos.

Pinocitosis; representa un conjunto de vías de internalización activas en diversas células. Se clasifica en macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina (Kristensen et al. 2016).

2.8.2.1 Macropinocitosis

Está asociada con el plegado hacia adentro de la superficie externa de la membrana plasmática, que da lugar a la formación de vesículas llamadas macropinosomas. Los macropinosomas resultantes están rodeados por membranas similares a la membrana celular y la proteína Dinamina es necesaria para la invaginación de la membrana (Madani et al. 2011).

2.8.2.2 Endocitosis mediada por clatrin y caveolas

En este mecanismo mediado por receptores, las proteínas clatrina y caveolina cubren la parte intracelular de la membrana, siendo necesarias para la invaginación y ayudan a formar las vesículas después de unir la molécula extracelular al receptor de membrana. Las vesículas revestidas con clatrin tienen un diámetro de pocos cientos de nanómetros, mientras las cargadas con caveolas son de alrededor de 50 a 80 nanómetro de diámetro (Jones 2007; Guo et al. 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

El líquido de ascitis maligno representa un microambiente tumoral rico en moléculas solubles con actividad en diversos tipos de células, tanto del sistema inmune como en células cancerosas y fibroblastos. En las células cancerosas se ha demostrado que las moléculas ejercen un efecto pro- y anti-tumoral dependiendo del perfil proteico que posea. El péptido CIB1R fue identificado en muestras de líquidos de ascitis maligna de pacientes con diferentes tipos de neoplasias primarias, las cuales presentaron un efecto inmunosupresor en células mononucleares de sangre periférica. La secuencia de CIB1R alinea con el dominio citoplasmático de la proteína Neprilisina, la cual se sabe que regula el proceso de migración celular cuando interacciona con PTEN y Lyn fosforilada; sin embargo, la expresión de dicha proteína en cáncer de pulmón de células no pequeñas se ve disminuida favoreciendo así sus propiedades invasoras. La evaluación del efecto ejercido por el péptido en la migración y proliferación en un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón nos puede conceder nuevas herramientas para el diseño de terapias alternativas que permitan contrarrestar los procesos de crecimiento celular, angiogénesis y metástasis.

4. HIPÓTESIS

El péptido CIB1R, derivado de la región citoplasmática de la proteína Neprilisina, posee la capacidad de regular el proceso de migración celular en un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

Evaluar el efecto *in vitro* ejercido por el péptido CIB1R, derivado del dominio citoplasmático de Neprilisina, en el proceso de migración en las células de cáncer de pulmón A-549.

5.2 Específicos:

1. Determinar el efecto citotóxico del péptido CIB1R en la línea celular A-549.
2. Analizar el efecto del péptido CIB1R en la migración celular de la línea A-549.
3. Evaluar la inhibición de la invasión y adhesión celular inducida por el péptido CIB1R.
4. Demostrar la captura del péptido CIB1R por las células A-549.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental

Para el análisis del efecto *in vitro* del péptido CIB1R se implementó como modelo de estudio la línea celular de cáncer de pulmón A-549. Se realizaron diferentes determinaciones involucradas con la captura del péptido, así como estudios de viabilidad. Para conocer el efecto del péptido en el proceso de metástasis, se evaluó la inhibición de la migración e invasión celular, ya que se ha reportado que la secuencia del péptido forma parte de la región de la proteína Neprilisina que modula estos procesos.

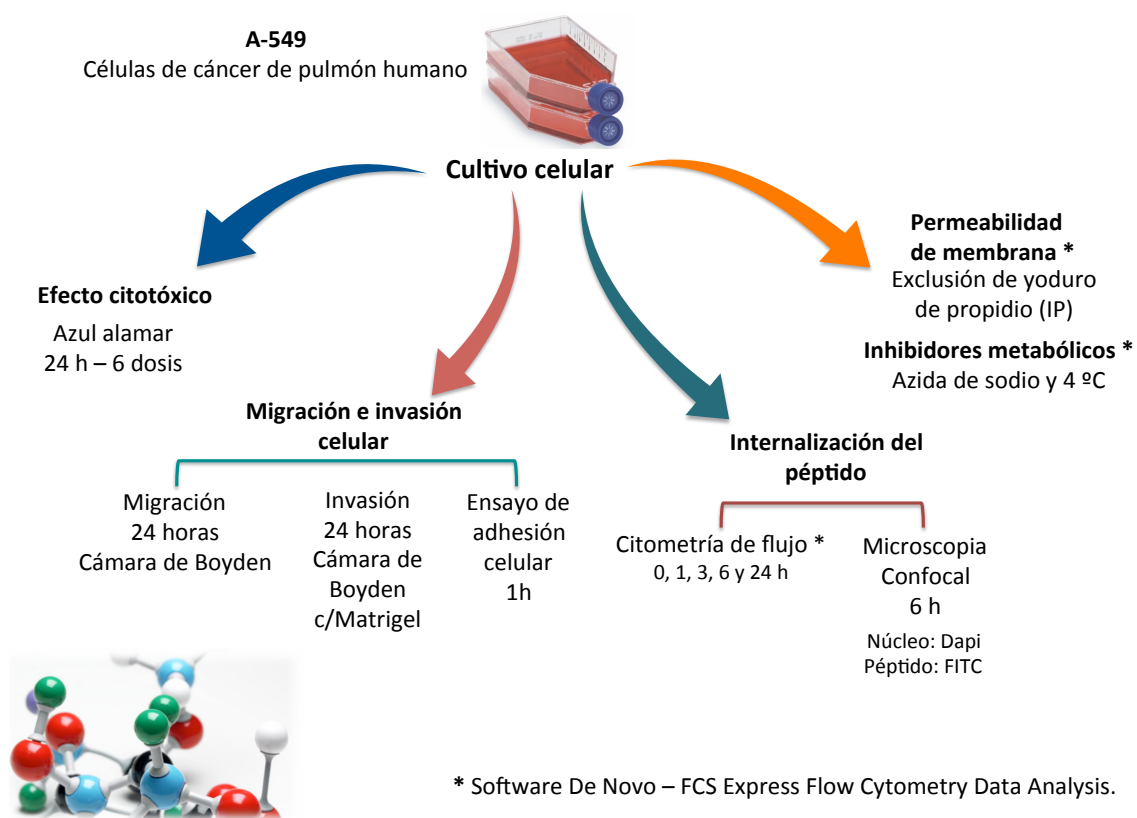


Figura 7. Diagrama de la estrategia experimental implementada. Se muestran los métodos evaluados en el proyecto divididos en 4 enfoques; efecto citotóxico, migración e invasión celular, internalización del péptidos y permeabilidad de membranas

6.2 Metodología

6.2.1. Resuspensión de péptidos

Se obtuvieron 4 secuencias peptídicas de la casa comercial Bio-Basic; CIB1R, péptido de trabajo. PS, péptido scrambled del péptido de trabajo. CTT, péptido control inhibidor de la migración e invasión celular (Koivunen et al. 1999). PC, dominio citoplasmático de la proteína Neprilisina. Cada una de las secuencias se adquirió con una pureza mayor del 95%, dichos análisis se realizaron mediante HPLC-MZ/MZ por la casa comercial.

El liofilizado de cada secuencia fue almacenado a -20 °C en un desecador con gel de sílice hasta su uso, siguiendo las especificaciones del proveedor.

El liofilizado total de cada una de las secuencias se resuspendió en agua milliQ obteniendo una solución madre a una concentración de 9 mg/mL, la cual fue alicuotada y almacenada a -20 °C.

Las diluciones de trabajo se prepararon de acuerdo a las concentraciones molares requeridas para el estudio empleando medio de cultivo DMEM libre de suero como vehículo y se mantuvieron a 4 °C durante la realización de los ensayos.

6.2.2. Cultivo Celular

En este trabajo se utilizó la línea celular de cáncer de pulmón A-549 como modelo de estudio. Dicha línea fue amablemente otorgada por la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

Se implementó la línea celular 55x, fibroblastos de pulmón humano para comparar el efecto citotóxico de las secuencias peptídicas ejercido en células no malignas con la línea de cáncer de pulmón. Los fibroblastos de pulmón humano fueron otorgados amablemente por la Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera, investigadora del

Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Las líneas celulares A-549 y 55x obtenidas de ATCC, se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (medio completo), con un pH de 7.4. El cultivo se realizó en frascos de 25 cm² en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C hasta obtener una confluencia del 70 - 80% y cambiando medio de cultivo cada 72 h.

6.2.3. Viabilidad celular

6.2.3.1 Ensayo Azul alamar

Las células de cáncer de pulmón A-549 se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 6x10³ células/pozo en medio completo. La placa se incubó a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h para permitir la adhesión celular. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se agregó cada péptido a evaluar (800, 400, 200, 100, 50, 25 µM) considerando un volumen final de 0.1 mL de medio de cultivo por pozo. La placa se incubó nuevamente por 24 h bajo las condiciones previamente mencionadas. El tratamiento fue retirado y se añadieron 100 µL de medio de cultivo completo más 10 µL de solución de Azul alamar a cada pozo. La placa se incubó durante 2.5 h a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% y se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (BioTek Synergy HT). Se empleó como control positivo medio DMEM suplementado y como control negativo Tritón X-100 al 0.1%. El promedio de la absorbancia del control positivo se consideró como 100% de viabilidad celular. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

Las fibroblastos de pulmón 55x se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 7x10³ células/pozo en medio completo. Para permitir la adhesión celular, la células se incubaron por 24 h a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 µL de medio de cultivo completo que contenía cada péptido a evaluar a las dosis de 800, 400, 200, 100, 50 y 25

μM . La placa se incubó nuevamente por 24 h bajo las condiciones previamente mencionadas. El tratamiento fue retirado y se añadieron 100 μL de medio de cultivo completo más 10 μL de solución de Azul alamar a cada pozo. La placa se incubó durante 3 h a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5% y se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (BioTek Synergy HT). Se empleó como control positivo medio DMEM suplementado y como control negativo Tritón X-100 al 0.1%. El promedio de la absorbancia del control positivo se consideró como 100% de viabilidad celular. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

6.2.4. Análisis del efecto *in vitro* en la migración celular

Para los ensayos de migración se utilizaron cámaras de Boyden (Transwell) en caja de 24 pozos (Corning), los cuales contienen una membrana de policarbonato con poros de 8 μm que funciona como un soporte permeable para cultivo celular (se hace una representación del sistema en la figura 8). Las células se cultivaron en frasco de cultivo de 25 cm^2 hasta presentar una confluencia del 80 al 90%, posteriormente se realizó cambio de medio completo por DMEM libre de SFB y se incubaron por 8 h. Las células fueron recolectadas mediante tripsinización y recuperadas en medio DMEM conteniendo 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albúmina de suero bovino para inactivar la tripsina. Se procedió a realizar una suspensión celular $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ en DMEM libre de suero y se colocó un volumen de 100 μL en la cámara superior del Transwell junto con la dosis del péptido a evaluar (CIB1R: 800, 500, 200 y 100 μM . PC y PS: 306 μM . CTT: 500 μM). En la cámara inferior del mismo, se colocaron 0.65 mL de medio de cultivo suplementado con SFB al 10% como quimioatrayente. Después de 24 h de incubación, las células de la parte superior del Transwell fueron removidas con un hisopo de algodón estéril y las células que migraron hacia la parte inferior de la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min, seguido de 2 lavados con PBS. Las células se tiñeron con DAPI para ser analizadas bajo el microscopio confocal multifotónico Leica TCS SP8 AOBS DMI6000 (Leica Microsystems). Se consideraron 5 campos al azar del área del filtro para cuantificar la migración. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de migración de las células tratadas con el péptido respecto al control. Se asignó un valor

arbitrario de 100% a la muestra control. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

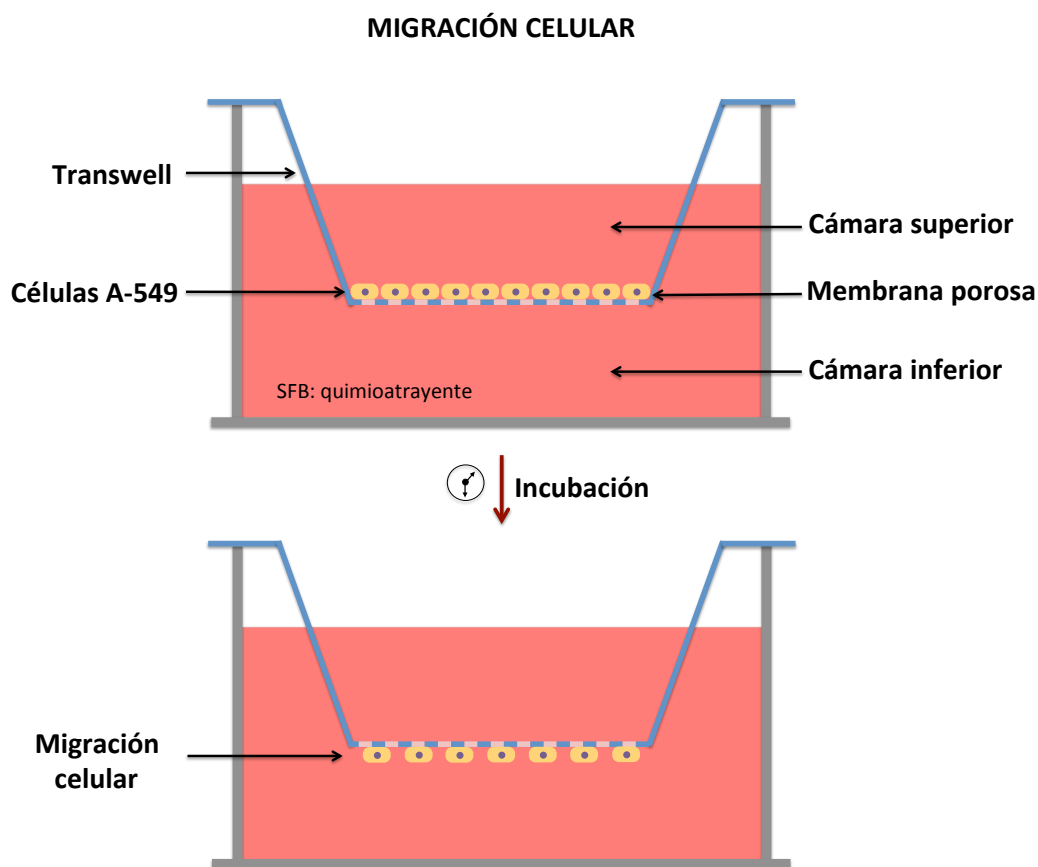


Figura 8 Representación del sistema de migración celular.

6.2.5. Ensayo de invasión de celular

Los Transwells de 8 μm de poro colocados en placas de 24 pocillos fueron recubiertos con 70 μL de Matrigel 0.6 mg/ml (Corning) e incubados a 37 °C durante 2 h para dejar polimerizar, representación del sistema en la figura 9. Se realizó una solución de 2.5×10^5 células/mL en DMEM libre de suero, las cuales fueron recolectadas mediante tripsinización de un cultivo previamente incubado por 8 h en medio libre de SFB; para inactivar la tripsina se utilizó medio DMEM suplementado con 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de albúmina de suero bovino. Un volumen de 100 μL de la suspensión celular fue colocado en la parte superior del Transwell junto con la dosis del péptido a evaluar (306 μM). Se utilizó medio suplementado con SFB al 10% como quimioatrayente en la parte inferior del

Transwell. Luego de transcurridas 24 h para permitir la invasión celular, las células de la parte superior del Transwell fueron removidas con un hisopo de algodón estéril y las células que invadieron la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min, seguido de 2 lavados con PBS. Las células se tiñeron con DAPI para ser analizadas bajo el microscopio confocal multifotónico Leica TCS SP8 AOBS DMI6000 (Leica Microsystems). Se consideraron 5 campos al azar del área del filtro para cuantificar la invasión celular. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de invasión de las células tratadas respecto al control. Se asignó un valor arbitrario de 100% a la muestra control. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

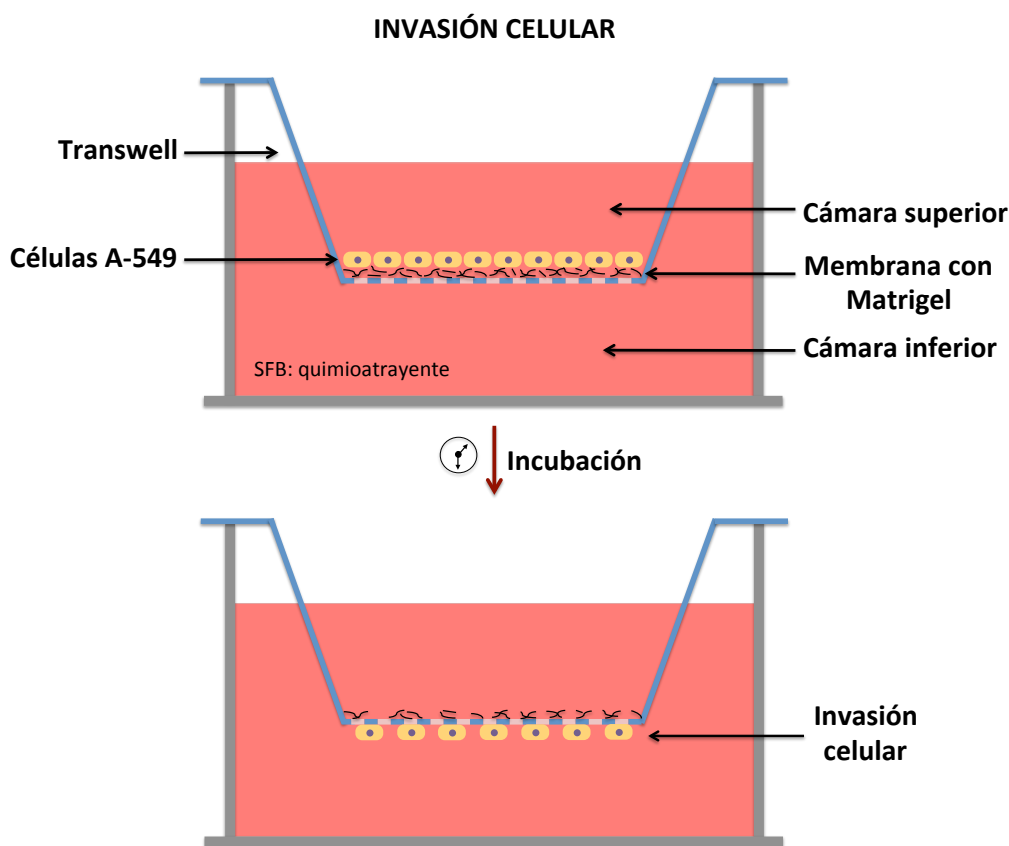


Figura 9. Representación del sistema de invasión celular. Membrana polimerizada con Matrigel, la cual simula la matriz extracelular. En el proceso las células deben degradarla mediante la producción de MMP-2 y MMP-9 y después migrar a través de la membrana.

6.2.6. Inhibición de la adhesión celular

Placas de 96 pocillos fueron cargadas con 70 μL de Matrigel 0.6 mg/mL (Corning) e incubados a 37 °C durante 2 h para dejar polimerizar. Se procedió a realizar una solución de 2.5×10^5 células/mL en medio completo y un volumen de 100 μL fue colocado en cada pocillo junto con la dosis del péptido a evaluar (306 μM). Se incubó por 1 h a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5%. El tratamiento fue retirado y se realizaron 3 lavados con PBS, posteriormente se añadieron 100 μL de medio de cultivo completo más 10 μL de solución de Azul alamar a cada pocillo. La placa se incubó durante 2.5 h a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5% y se procedió a leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (BioTek Synergy HT). Se empleó como control positivo medio completo. La absorbancia del control se consideró como el 100% de adhesión celular. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

6.2.7. Evaluación de la captura peptídica

6.2.7.1 Análisis de captación mediante citometría de flujo

Se realizó el cultivo a una densidad de 3×10^4 células en placas de 24 pozos. Después de 24 h se agregó la IC_{50} (306 μM) de los péptidos CIB1R, PS y PC marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se incubaron por diferentes períodos (1, 3, 6, y 24 h). Finalizado el período de incubación, se retiraron los péptidos seguido de 2 lavados con PBS. Las células fueron recuperadas mediante tripsinización, lavadas 2 veces con PBS y finalmente resuspendidas en 0.4 mL de PBS. Se procedió a analizar por citometría de flujo en un FACS Accuri C6 (BD Biosciences) cuantificando la ganancia de la fluorescencia de la población celular positiva para FITC. La emisión de la fluorescencia de 10,000 células vivas fue adquirida en el canal FL1. Los datos fueron analizados en el software De Novo – FCS Express Flow Cytometry Data Analysis. El procedimiento experimental se realizó bajo condiciones de oscuridad. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

6.2.7.2 Análisis fluorométrico mediante microscopía confocal

Se cultivaron las células a una densidad de 3×10^4 en placas de 24 pozos, los cuales contenían cubreobjetos porosos y estériles. Después de 24 h se añadió la IC₅₀ (306 μ M) de lo péptido CIB1R, PS y PC marcados con FITC y se incubaron por 6 h. Se procedió a lavar las células con PBS para retirar el exceso de péptido en cada pozo y finalmente fueron teñidas con DAPI y montadas para su lectura. Las muestras se mantuvieron en oscuridad en todo momento hasta su análisis, realizado en un microscopio confocal multifotónico Leica TCS SP8 AOBS DMI6000 (Leica Microsystems). Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

6.2.7.2 Inhibidores metabólicos

Se realizó el cultivo a una densidad de 3×10^4 células en placas de 24 pozos, después de 24 h se incubaron por 30 min a 4 °C y para reducir la concentración de ATP se incubaron en azida de sodio 10 mM por 1 h. Posteriormente, se agregó la IC₅₀ (306 μ M) de los péptidos CIB1R, PS y PC marcados con FITC y se incubaron por 1 h a 4 °C y 37 °C (azida de sodio). Las células se lavaron 2 veces con PBS y fueron recuperadas mediante tripsinización. Se procedió con 2 lavados con PBS y finalmente fueron resuspendidas en 0.4 mL de PBS. Se procedió a analizar por citometría de flujo en un FACS Accuri C6 (BD Biosciences) cuantificando la ganancia de la fluorescencia de la población celular positiva para FITC. La emisión de la fluorescencia de 10,000 células vivas fue adquirida en el canal FL1. Los datos fueron analizados en el software De Novo – FCS Express Flow Cytometry Data Analysis. El procedimiento experimental se realizó bajo condiciones de oscuridad. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

6.2.8. Ensayo de permeabilidad de membranas (captación de IP)

Se cultivaron las células a una densidad de 3×10^4 en placas de 24 pozos durante 24 h. Las células fueron incubadas posteriormente por 24 h con la IC₅₀ del péptido (306 μ M), se lavaron con PBS y se procedió a recuperarlas por tripsinización. La tripsina fue inactivada con medio completo y se procedió a lavar mediante centrifugación.

Finalmente las células se resuspendieron en 0.4 mL de solución de tinción (IP 50 µg/mL en PBS) y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se procedió a analizar por citometría de flujo en un FACS Accuri C6 (BD Biosciences) la permeabilidad de la membrana mediante la captura de IP. La emisión de la fluorescencia de 10,000 células vivas fue adquirida en el canal FL2 y los datos fueron analizados en el software De Novo – FCS Express Flow Cytometry Data Analysis. Cada experimento fue realizado por triplicado y repetido al menos en 2 ocasiones.

6.2.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico los datos fueron representados por medias con su desviación estándar. Para comparar la diferencia entre 2 grupos se realizó el análisis mediante prueba t de Student y para comparación de múltiples grupos se realizó ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Tukey, previamente valorada la normalidad de los datos por la prueba de Shapiro-Wilk. Se tomó como significativo un valor para $p < 0.05$. El análisis se realizó en el programa estadístico GraphPad Prism 6.

7. RESULTADOS

7.1 Diseños tridimensionales y características físico-químicas de las secuencias peptídicas.

Empleando la herramienta bioinformática PEP-FOLD Peptide Structure Prediction Server se obtuvieron las predicciones tridimensionales de las 3 secuencias peptídicas en estudios, péptido Scrambled (PS), péptido CIB1R y péptido del dominio citoplasmático (PC). Se presentan los modelos 3D obtenidos en la figura 10.

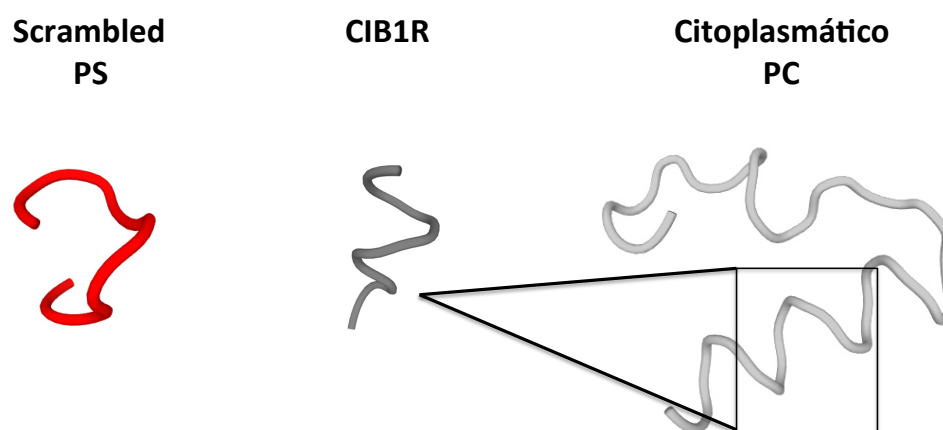


Figura 10. Estructuras tridimensionales de las secuencias peptídicas.

La secuencia peptídica de CIB1R es conformada por un total de 7 aminoácidos, de los cuales 6 forman parte de la región básica del dominio citoplasmático de Neprilisina. El péptido PC conforma el 100% del dominio citoplasmático de la proteína. Se observa un cambio en la conformación del PS comparado con CIB1R, lo que nos permitió inferir si el efecto del péptido CIB1R es dependiente de su secuencia y estructura.

En la tabla 2 se muestran las características físico-químicas de cada una de las secuencias peptídicas, los datos fueron obtenidos en la plataforma bioinformática Peptide Property Calculator ver 3.1. Como se puede observar, las 4 secuencias presentan un carga neta positiva, lo cual es ideal para que puedan interaccionar con la membrana celular y sean internalizados para que ejerzan una función. En cuanto a su perfil de hidrofobicidad, solamente el péptido PC presenta un 18.52% de aminoácidos

hidrofóbicos, sin embargo la cantidad de aminoácidos ácidos y básicos es mayor, confiriéndole buenas propiedades de solubilidad. Los péptidos CIB1R y PS presentan en su secuencia aminoácidos básicos (4:7). Ninguna de las 3 secuencias presentó precipitación después de haber sido disueltos.

Tabla 2. Características físico-químicas de las secuencias peptídicas.

Péptido	PS	CIB1R	PC
Composición de la secuencia:			
# aminoácidos	7	7	27
básicos	57.14 %	57.14 %	22.22
neutros	42.86 %	42.86 %	44.44
ácidos			14.81
hidrofóbicos			18.52
Carga neta	+4	+4	+2
Punto isoeléctrico:	11.11	11.11	10.12
Peso molecular	853 Da	853 Da	3.15 KDa

Las secuencias de cada uno de los péptidos se reportan a continuación;

PS:



CIB1R:



PC:



7.2 Efecto del péptido CIB1R en la viabilidad celular.

Se determinó el efecto del péptido CIB1R en la viabilidad de la línea celular A-549 a las 24 h mediante el método de azul alamar, el cual determina la actividad metabólica de las células. Las dosis evaluadas en el ensayo fueron 800, 400, 200, 100, 50 y 25 μM . Los

resultados mostraron que no existe un efecto inhibitorio de la viabilidad incluso a la dosis más alta evaluada, lo cual indica que el péptido CIB1R no presenta actividad citotóxica en la línea A-549 de cáncer de pulmón.

De igual forma se evaluó el efecto de los péptidos PS y PC en la viabilidad de la línea celular A-549 a las mismas dosis evaluadas en el péptido CIB1R. Como resultado de la prueba azul alamar, no se observaron cambios significativos en el efecto citotóxico a las 24 h. Así mismo, se realizó la evaluación del efecto del péptido control CTT a la dosis de 250 y 500 μM , las cuales han demostrado que inhiben la migración celular en otras líneas de cáncer. CTT afectó la viabilidad de la línea celular A-549 en un 7% con la dosis de 250 μM y un 9% a 500 μM , la diferencia estadística no fue significativa en ninguna de las dos dosis. Los resultados de la viabilidad de las células A-549 expuestas a las distintas dosis de los péptidos se muestran en la figura 11.

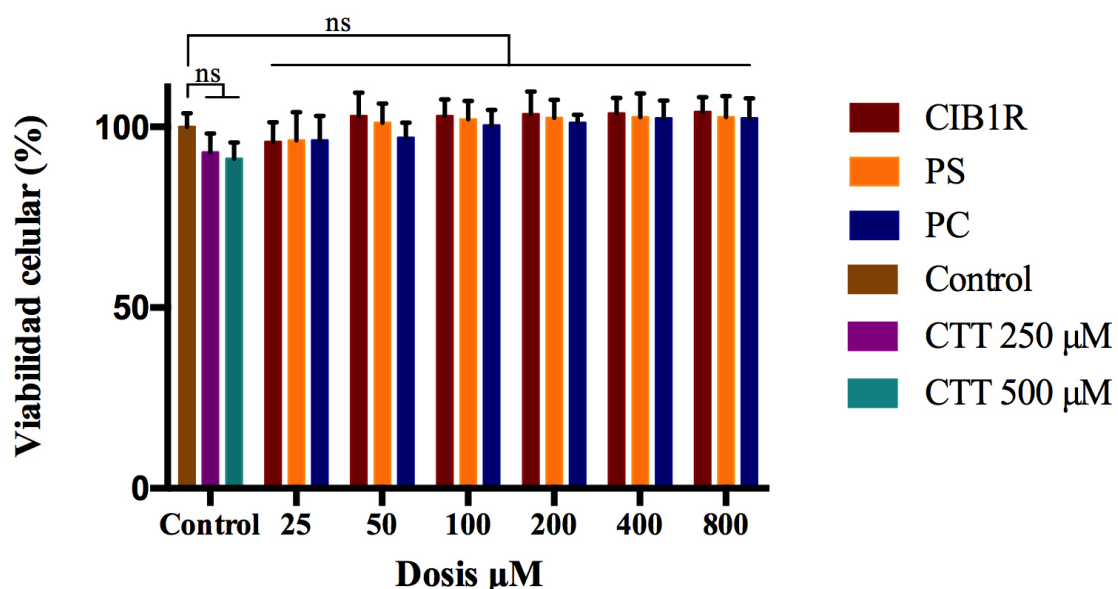


Figura 11. Efecto de la viabilidad de los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT en la línea celular A-549. La viabilidad se evaluó a las 24 h mediante el ensayo de azul alamar a diferentes dosis sin mostrar efectos estadísticamente significativos. Los datos son presentados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. ns, diferencia no significativa.

Así mismo, se determinó la viabilidad de la línea celular 55x al ser expuesta a diversas dosis de los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT. El péptido CIB1R no presentó efecto citotóxico en la línea celular 55x incluso a la dosis de 800 μ M. La diferencia entre los grupos CIB1R y control no fue estadísticamente significativa, lo cual demuestra que esta secuencia mantienen el mismo perfil tanto en células de cáncer de pulmón como en células de pulmón no malignas.

Similarmente, los péptidos PS y PC se evaluaron a distintas dosis que fueron desde 25 μ M hasta 800 μ M, los cuales no ejercieron una disminución en la viabilidad de la línea celular 55x. La integridad celular de los fibroblastos de pulmón humano se mantuvo después de 24 h de incubación, incluso a dosis elevadas de 800 μ M.

En péptido control CTT no mostró efectos citotóxicos significativos en los fibroblastos de pulmón humano 55x. La viabilidad disminuyó solamente en un 4% con la dosis de 250 μ M y un 5% a 500 μ M, la diferencia estadística no fue significativa respecto al control en ninguna de las dos dosis. Los resultados de la viabilidad de las células 55x expuestas a las distintas dosis de los péptidos se muestran en la figura 12.

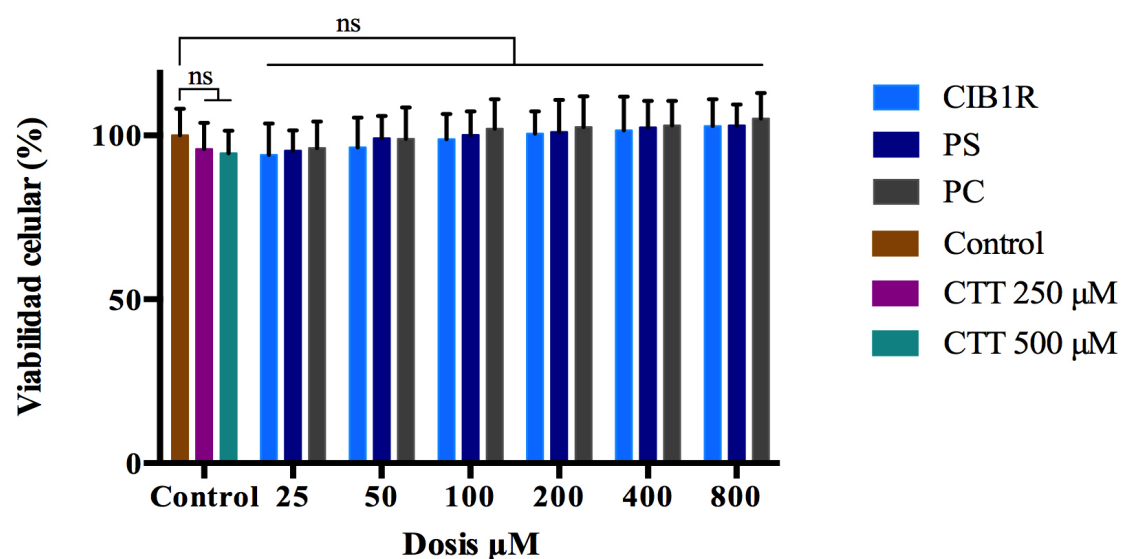


Figura 12. Efecto de la viabilidad de los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT en la línea celular 55x. La viabilidad se evaluó a las 24 h mediante el ensayo de azul alarmar a diferentes dosis sin mostrar efectos estadísticamente significativos. Los datos son presentados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. ns, diferencia no significativa.

Al no mostrar el péptido CIB1R un efecto citotóxico, se procedió a evaluar la migración celular de la línea A-549 en presencia del péptido CIB1R para obtener una IC_{50} de la migración y proceder con esta dosis en las siguientes determinaciones de invasión celular, captación peptídica y estabilidad en la permeabilidad de la membrana celular.

Así mismo, para evaluar el efecto de los péptidos PS y PC en las determinaciones anteriormente mencionadas, se implementó la IC_{50} de la migración celular registrada por el péptido CIB1R. Lo cual nos permitió determinar si existe o no una diferencia entre los efectos ejercidos por las 3 secuencias peptídicas.

El péptido CTT se evaluó a la dosis de 500 μ M, la cual ha sido anteriormente reportada que presenta un efecto inhibitorio en la migración e invasión celular de diversas líneas de cáncer.

7.3 Inhibición de la migración celular ejercida por CIB1R.

El efecto del péptido CIB1R fue evaluado en la migración celular a las dosis de 800, 500, 250, 100 y 50 μ M empleando cámaras de Boyden (Transwell). Para la cuantificación, las células presentes en la membrana inferior del Transwell fueron teñidas con DAPI y se realizó un conteo de los núcleos usando un microscopio confocal.

Los resultados arrojaron la existencia de un efecto en la inhibición de la migración celular dependiente de la dosis, lo cual fue estadísticamente significativo comparado contra el control.

En la figura 13 se muestra la migración de las células de cáncer de pulmón A-549 cuando fueron expuestas al péptido CIB1R a las dosis de 50, 100, 250, 500 y 800 μ M, inhibiendo la migración celular estimulada con SFB al 10% en un 16.7, 25.4, 42.3, 75.8 y 82.9%, respectivamente.

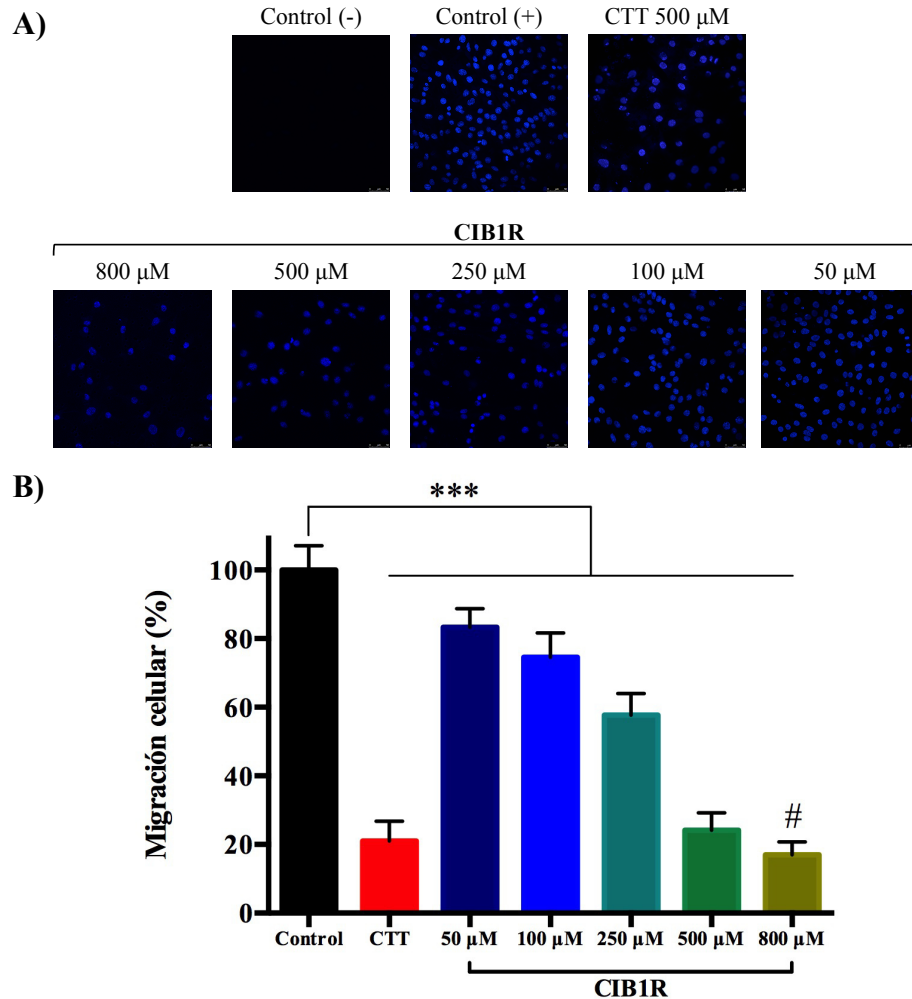


Figura 13. CIB1R inhibe la migración de las células A-549. A) Efecto del péptido CIB1R y CTT en la migración después de 24 h. B) Análisis del grado de migración presentado en las distintas dosis del péptido CIB1R y CTT. Los datos son representados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$ diferencia significativa con el grupo control. # $p < 0.05$ diferencia significativa contra CTT.

El péptido CTT a las dosis de 500 μ M inhibió en un 78.9% la migración comparado contra el control. De igual manera se evaluó la migración de las células A-549 en condiciones no estimulantes, en donde no se encontró la presencia de células en la membrana de policarbonato del Transwell, por lo cual no fue necesario realizar una normalización de la migración celular estimulada.

En base al efecto ejercido por el péptido CIB1R en el proceso de migración celular, se obtuvo la IC_{50} con los datos de la inhibición de cada dosis evaluada mediante el método de regresión no lineal (log dosis vs porcentaje de inhibición) empleando el software GraphPad Prism 6. Como se muestra en la figura 14, se obtuvo el valor de 306 μ M como la IC_{50} de la inhibición de migración.

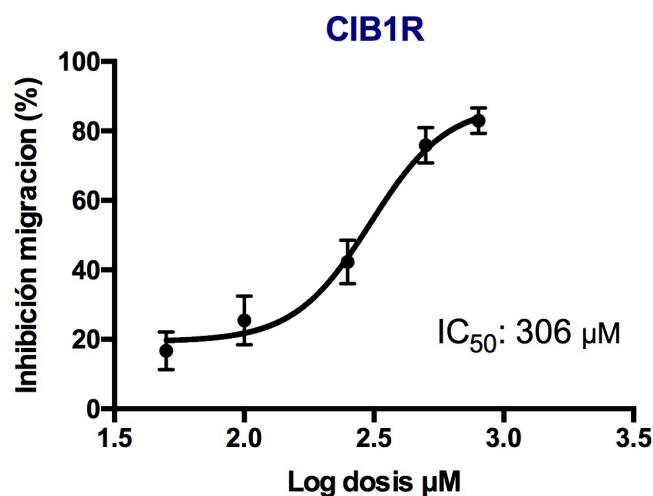


Figura 14. Gráfica dosis – respuesta de la inhibición de la migración celular.

Una vez obtenida la IC_{50} del péptido CIB1R, se evaluó el efecto de los péptidos PS y PC en la migración celular a la dosis de 306 μ M para compararlo con el ejercido por el péptido CIB1R.

En la figura 15 se muestra la migración que presentaron las células A-549 cuando se trataron con los péptidos PC y PS durante 24 h; PS registró una migración del 61.4% y PC un 41.6%. El tratamiento con ambos péptidos presentó un efecto estadísticamente significativo comparado con el control, así como entre ellos.

Lo anterior demuestra que el péptido PC fue el que reguló mayormente la migración de las células A-549, comparando con el péptido CIB1R que a una dosis de 306 μ M inhibe el 50%. Por otra parte CIB1R presenta mayor efecto comparado con PS, lo cual se puede deber al cambio que presentan en sus secuencias, permitiendo a CIB1R mayor afinidad por la molécula diana.

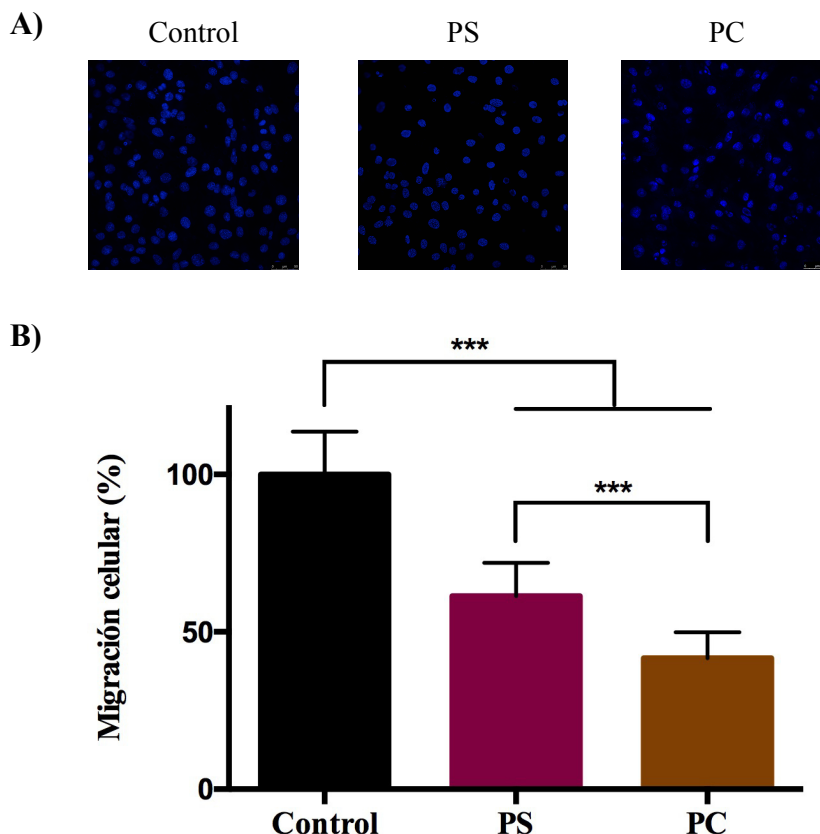


Figura 15. Efecto de los péptidos PS y PC en la migración celular. A) Imágenes representativas del efecto de los péptidos PS y PC en la migración celular. B) Análisis del grado de migración presentada a las 24 h en las células A-549 tratadas con los péptidos PS y PC. Los datos son representados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$ diferencia significativa entre los grupos.

7.4 El péptido CIB1R inhibe la invasión celular

Una vez estandarizada la técnica de invasión celular, donde se evaluaron 3 concentraciones distintas de Matrigel; 1.2, 0.6 y 0.3 mg/ml y estimulación con SFB al 10 y 20% como quimioatrayente. Se determinó que la concentración idónea para el ensayo fue de 0.6 mg/ml, ya que se presentó una invasión homogénea en comparación a la existente en la dosis de 1.2 mg/ml donde fue baja concentrándose en el centro de la membrana. En la dosis de 0.3 mg/ml la invasión fue elevada, pero no homogénea ya que se concentró principalmente en el centro de la membrana. En cuanto a la evaluación del porcentaje de SFB empleado como quimioatrayente, al 10% presentó mejor efecto de

quimioatrayente. En la figura 16 se muestran las membranas de la estandarización del método de invasión.

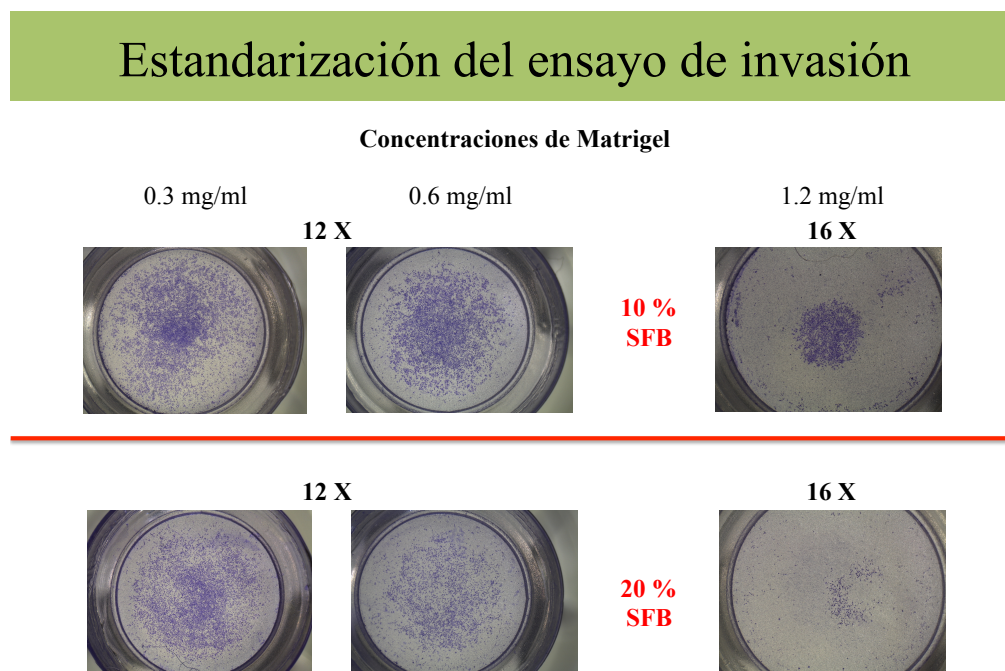


Figura 16. Estandarización del ensayo de invasión celular. Las células que invadieron a las 24 h fueron fijadas a las membranas y teñidas con cristal violeta para ser observadas en un microscopio estereoscópico Leica EZ4 con zoom de 12X y 16X.

Después de tratar las células con los péptidos CIB1R, PS y PC a la dosis de 306 μ M y CTT 500 μ M por 24 h, se evaluó su capacidad para degradar Matrigel e invadir a través de la membrana porosa. Los resultados se representan en la figura 17, donde se puede observar que los tratamientos con los péptidos CTT, CIB1R y PC resultaron en una invasión celular menor al 50% en comparación al control, lo cual arrojó una diferencia estadística con un $p < 0.001$. El péptido PS presentó una invasión celular del 75%, sin embargo al comparar con el control presentó una diferencia estadística significativa.

La invasión presentada en las células tratadas con el péptido PC (44.9%) fue menor en comparación al péptido CIB1R (50.4%), sin embargo la diferencia estadística no fue significativa. De igual forma el péptido CTT presentó una invasión del 39%, menor a la cuantificada en los péptidos CIB1R, PS y PC.

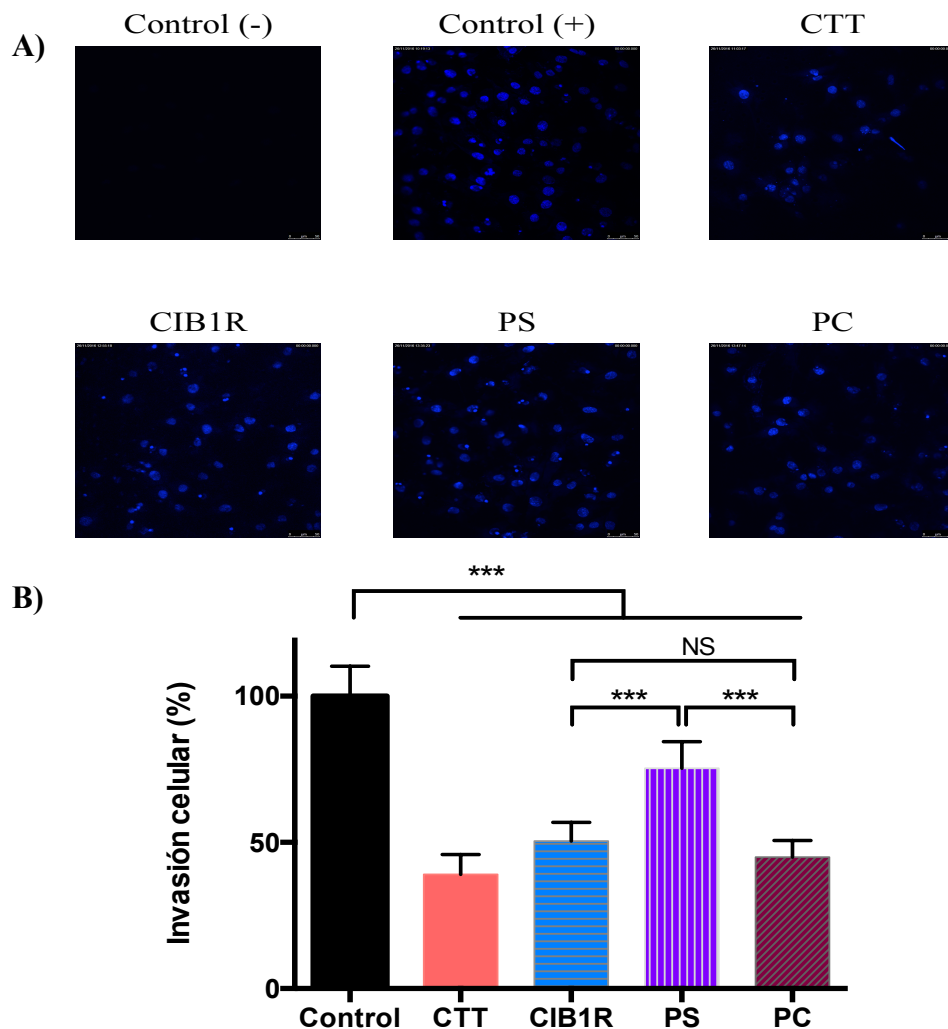


Figura 17. Los péptidos CIB1R, CTT, PS y PC inhiben la invasión celular. A) Efecto de los péptidos en la invasión celular después de 24 h. B) Análisis del grado de invasión presentada en las células A-549 tratadas con los péptidos CIB1R, CTT, PS y PC. Los datos son representados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$ diferencia significativa entre los grupos correspondientes; NS, diferencia no significativa.

Para descartar que el efecto mostrado por los péptidos en la migración e invasión celular no se debiera al bloqueo de la adhesión de las células A-549 a la membrana del Transwell o por modificación del citoesqueleto de las células, se determinó el grado de inhibición de la adhesión celular a las proteínas de la matriz extracelular. Para ello se implementó el uso de placas de cultivo celular polimerizadas con Matrigel 0.6 mg/ml.

7.5 Efecto de CIB1R en la adhesión celular

El ensayo de adhesión celular se realizó implementando Matrigel como matriz extracelular y el grado de adhesión se obtuvo mediante el ensayo de azul alamar, considerando la lectura de absorbancia del control como un 100% de adhesión celular. Las dosis empleadas para los péptidos CIB1R, PS y PC fue de 306 μ M y para el péptido CTT fue de 500 μ M.

El péptido CIB1R afectó la adherencia de las células A-549 en un 5.5% cuando se dejó en contacto por 1 h, así mismo el péptido PS, PC y CTT disminuyeron la adhesión en un 4.3, 10.9 y 14.9%, respectivamente. En base al análisis estadístico se reporta una diferencia significativa del efecto de los péptidos PC y CTT respecto al control, como se muestra en la figura 18.

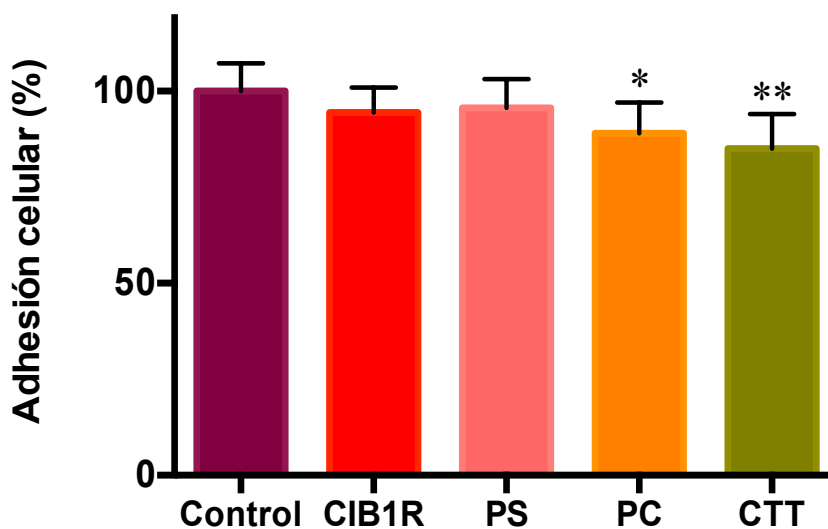


Figura 18. Inhibición de la adhesión celular. Análisis del efecto de los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT en la adhesión de las células A-549 a la matriz extracelular después de 1 h de tratamiento. Los datos son representados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ diferencia significativa entre los péptidos con el control.

Ante el efecto ejercido por los péptidos CIB1R, PS y PC en los procesos de migración, invasión y adhesión celular, se procedió a evaluar la captura del péptido mediante ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal.

7.6 Cinética de internalización peptídica

La captación de los péptidos CIB1R, PS y PC marcados con el fluorocromo FITC se analizó mediante citometría de flujo en los tiempos 1, 3, 6 y 24 h. La dosis evaluada para los 3 péptidos fue de 306 μ M. La secuencia que mostró mejores propiedades de internalización fue el péptido PC, el cual fue captado en los 4 tiempos por el 99% de las 10,000 células analizadas por el citómetro, presentando en cada tiempo un aumento de la fluorescencia.

El péptido CIB1R presentó una captación del 98% en las células A-549 después de 1 h de tratamiento, y posteriormente mantuvo su captación en un 99% en los tiempos 3, 6 y 24 h (tabla 3). El péptido PS fue captado inicialmente por el 74% de las células hasta llegar al 98 y 99% a las 3 y 6 h, respectivamente. Sin embargo, a las 24 h se observó que sólo un 78% de las células analizadas fueron positivas para el péptido PS, lo cual indica que esta secuencia presenta menor estabilidad y/o velocidad de internalización comparado con CIB1R y PC.

Tabla 3. Captación peptídica en las células A-549 tratadas con CIB1R, PS y PC.

Tiempo de incubación	Porcentaje de la población celular positiva para FITC		
	CIB1R	PS	PC
1 h	98.42 \pm 1.03	74.03 \pm 2.46	99.04 \pm 1.24
3 h	99.31 \pm 1.04	98.37 \pm 1.60	99.17 \pm 1.17
6 h	99.28 \pm 0.90	99.10 \pm 1.54	99.24 \pm 1.30
24 h	99.00 \pm 1.17	78.25 \pm 2.10	99.38 \pm 1.04

En la figura 19 se muestra la cinética de internalización y aumento de la fluorescencia presente en la población de células vivas mediante el uso de histogramas. Se representa la fluorescencia endógena de las células A-549 (morado) y al ser tratadas con los 3 péptidos de estudio; CIB1R (rojo), PS (azul) y PC (amarillo).

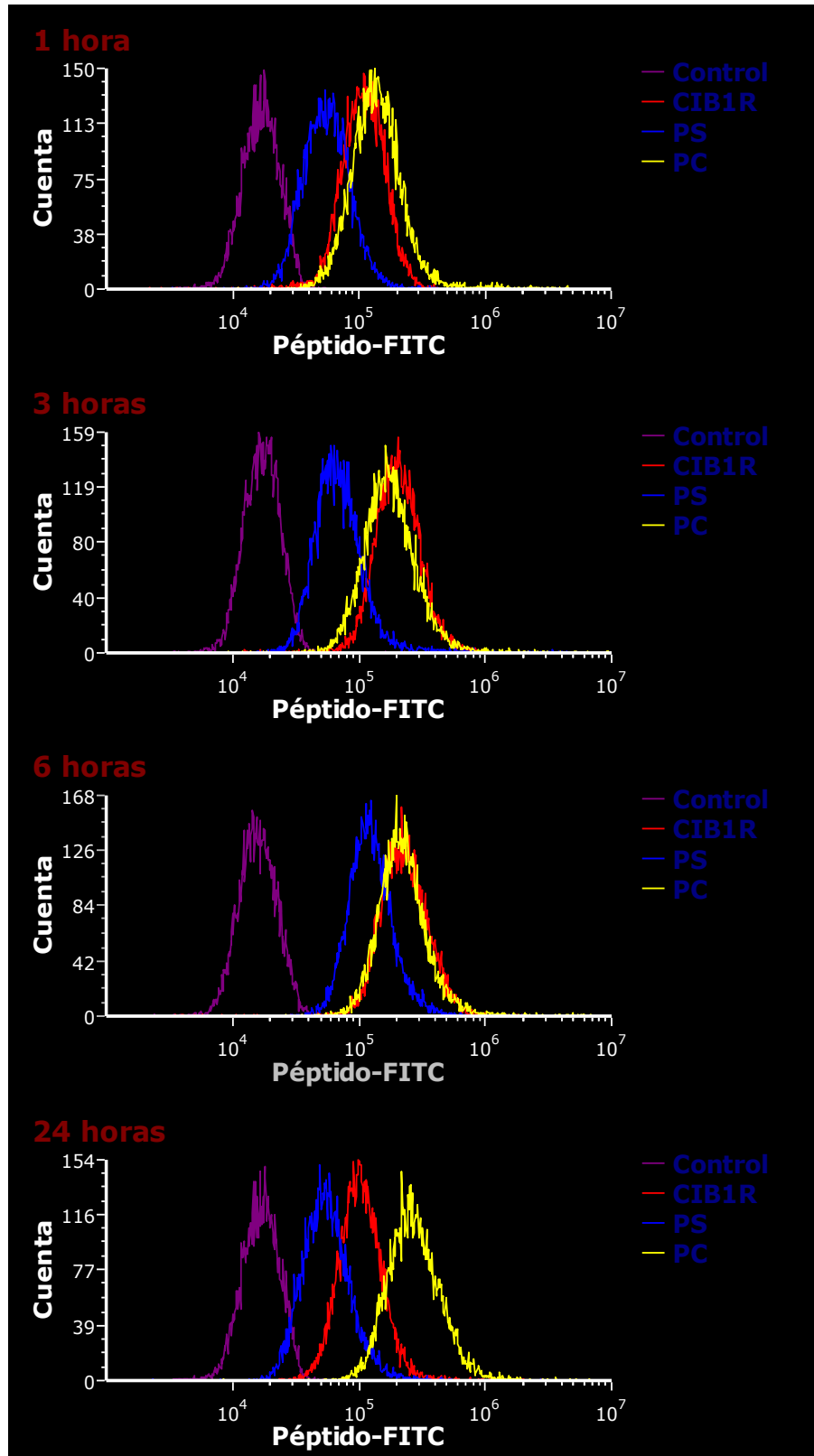


Figura 19. Cinética de internalización peptídica en las células A-549. Histogramas representativos de la captación peptídica después de 1, 3, 6 y 24 h de incubación de cada péptido a 37°C.

Se puede observar un desplazamiento de los histogramas hacia la derecha en las 3 secuencias peptídicas durante las primeras 6 h y una disminución en la intensidad de la fluorescencia en los péptidos CIB1R y PS a las 24 h. Lo anterior representa una ganancia de la fluorescencia relacionada directamente con la internalización del péptido.

Se calculó el radio de la fluorescencia considerando las unidades de fluorescencia relativa (RFU, por sus siglas en inglés) en la población de las células A-549 positivas para FITC respecto a las registradas en el control, esto con el fin de conocer el comportamiento de la ganancia de RFU en la población positiva para FITC en cada tiempo analizado.

Como se observa en la figura 20, el péptido PS fue el que menor internalización presentó, teniendo un máximo a las 6 h (9 RFU/control) y a las 24 h experimentó una disminución llegando a un nivel similar al presentado durante la 1er hora de captura (4 RFU/control). Esta tendencia fue repetida en con el péptido CIB1R pero con mayores niveles de captación, 1 y 24 h (7 RFU/control) y a las 6 h se presentó un máximo de 14 RFU/control. Lo cual indica que ambas secuencias pueden estar experimentando cierto grado de degradación dentro de la célula.

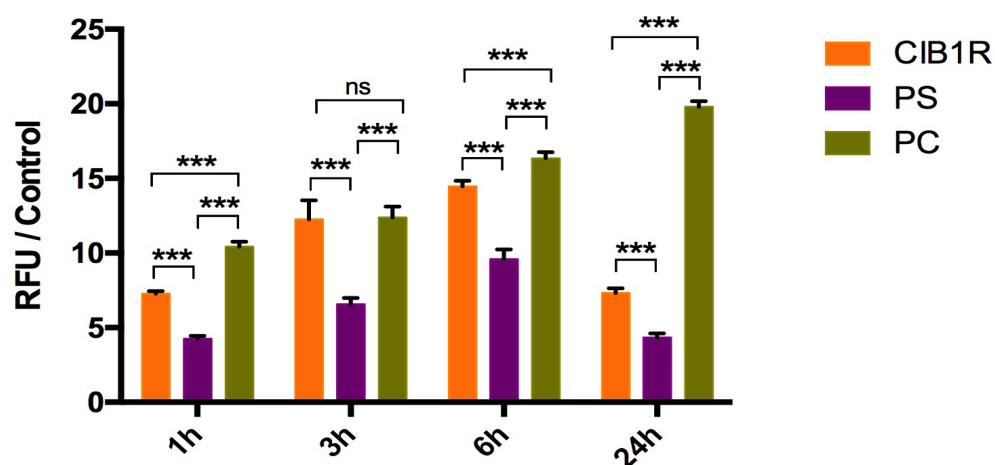


Figura 20. Índice de internalización de los péptidos CIB1R, PS y PC en las células A-549. La intensidad de fluorescencia fue determinada usando un citómetro de flujo Accuri C6 y es expresada la relación de RFU respecto al control. Los datos son representados por su media \pm DE de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$ diferencia significativa entre los grupos; ns, diferencia no significativa.

El péptido PC mantuvo un incremento constante en la ganancia de RFU en base al tiempo, iniciando su captura en 10 RFU/control después de la primer hora de incubación hasta llegar a las 19 RFU/control a las 24 h. Contradictorio a lo encontrado en PS y CIB1R, los cuales a las 24 h disminuyeron la cantidad de fluorescencia, esto se puede deber al ritmo de división celular y al grado de internalización de cada uno de los péptidos.

Lo anterior se corroboró estudiando la captación de los 3 péptidos implementando la técnica de microscopía confocal para determinar el alcance de internalización en la célula después de 6 h de incubación.

7.7 Distribución celular de la captura peptídica

En la figura 21 se muestran imágenes representativas de la captura peptídica en las células A-549 empleando la dosis de 306 μ M. Los péptidos CIB1R, PS y PC fueron capaces de internalizar en las células presentando una distribución homogénea en el citoplasma. Las 3 secuencias lograron internalizar al núcleo, el cual fue teñido con DAPI para su visualización (azul). El péptido PS presentó menor intensidad, sin embargo no hay cambios en la distribución citoplasmática y nuclear.

En las imágenes correspondientes al canal de contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés) se puede observar que no existen cambios en la morfología de las células a causa de la internalización del péptido, comparando con el control. Las células control fueron incubadas solamente con medio de cultivo y no se les practicó ninguna tinción.

Para descartar una posible internalización peptídica por inducción de la permeabilidad de membranas, se procedió a evaluar mediante citometría de flujo la captación de yoduro de propidio (IP). El IP en condiciones normales es incapaz de atravesar la membrana plasmática, ya que no es permeable.

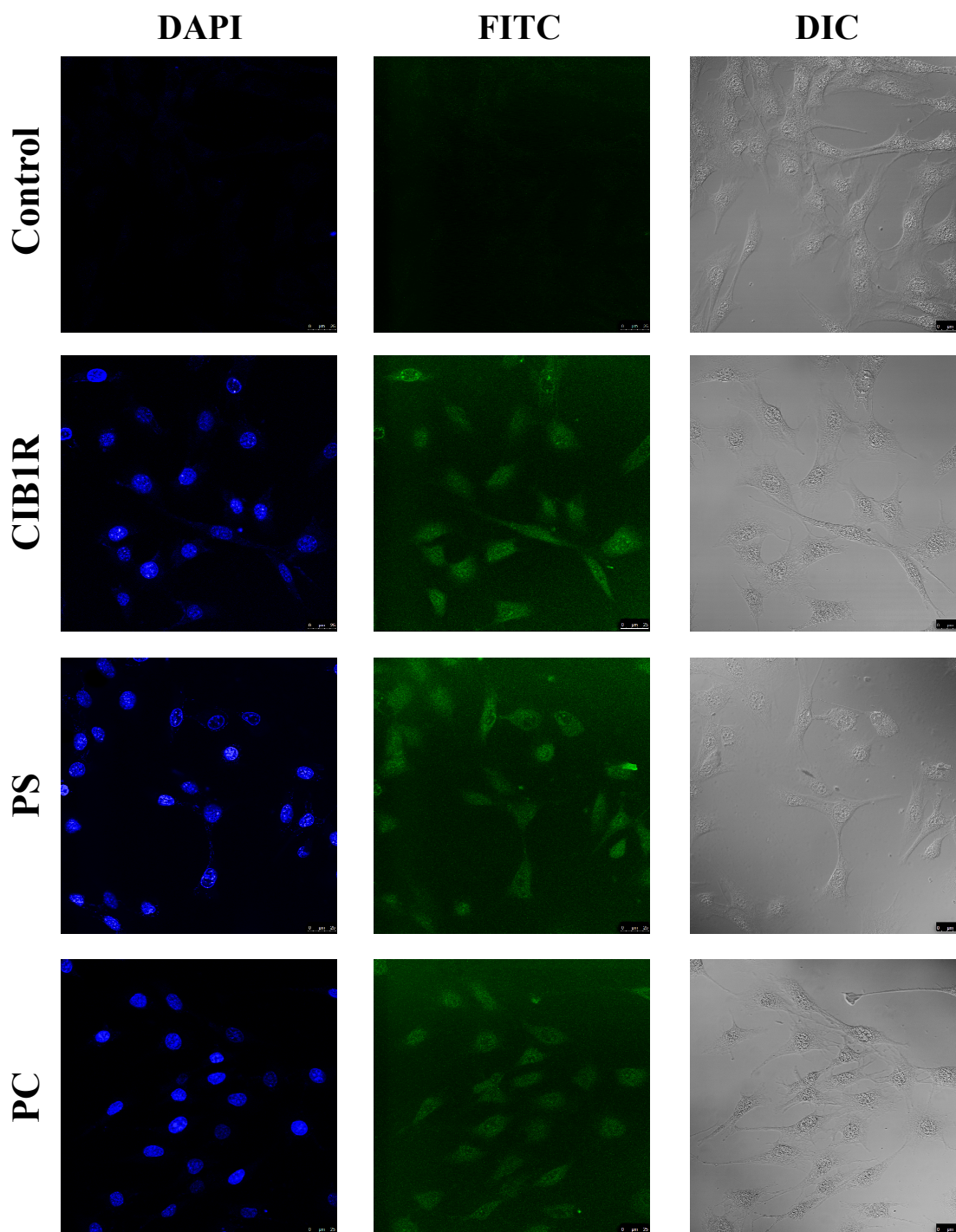


Figura 21. Distribución celular de los péptidos CIB1R, PS y PC internalizados. Las células fueron tratadas durante 6 h con cada uno de los péptidos marcados con FITC a la dosis de 306 μM e incubadas a 37°C. Las células control no fueron teñidas con ningún fluorocromo. DAPI: molécula intercaladora del ADN (fluorescencia azul); FITC: fluorocromo unido al extremo amino terminal del péptido (fluorescencia verde); DIC: contraste de interferencia diferencial (por sus siglas en inglés); CIB1R: péptido de trabajo; PS: péptido scrambled; PC: péptido dominio citoplasmático. Barra de escala: 25 μm .

7.8 Evaluación de la permeabilidad de la membrana celular

Las células fueron expuestas con los péptidos CIB1R, PS y PC a la dosis de 306 μM e incubadas por 24 h a 37 °C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%. En la figura 22 se observan los histogramas donde se representa la captura de IP en el eje de las abscisas (X) y la cuenta celular en eje de las ordenadas (Y).

Se demuestra que no hay ganancia considerable en la fluorescencia de las células A-549 después de 24 h de tratamiento con los péptidos, en comparación a las células tratadas con Tritón X-100 durante 5 minutos. Menos del 1% de la población tratada con los péptidos fue positiva para IP. El 100% de la población celular que fue tratada con Tritón X-100 presentó un alto índice de permeabilidad de la membrana, mostrando una elevada ganancia en la intensidad de fluorescencia emitida por IP.

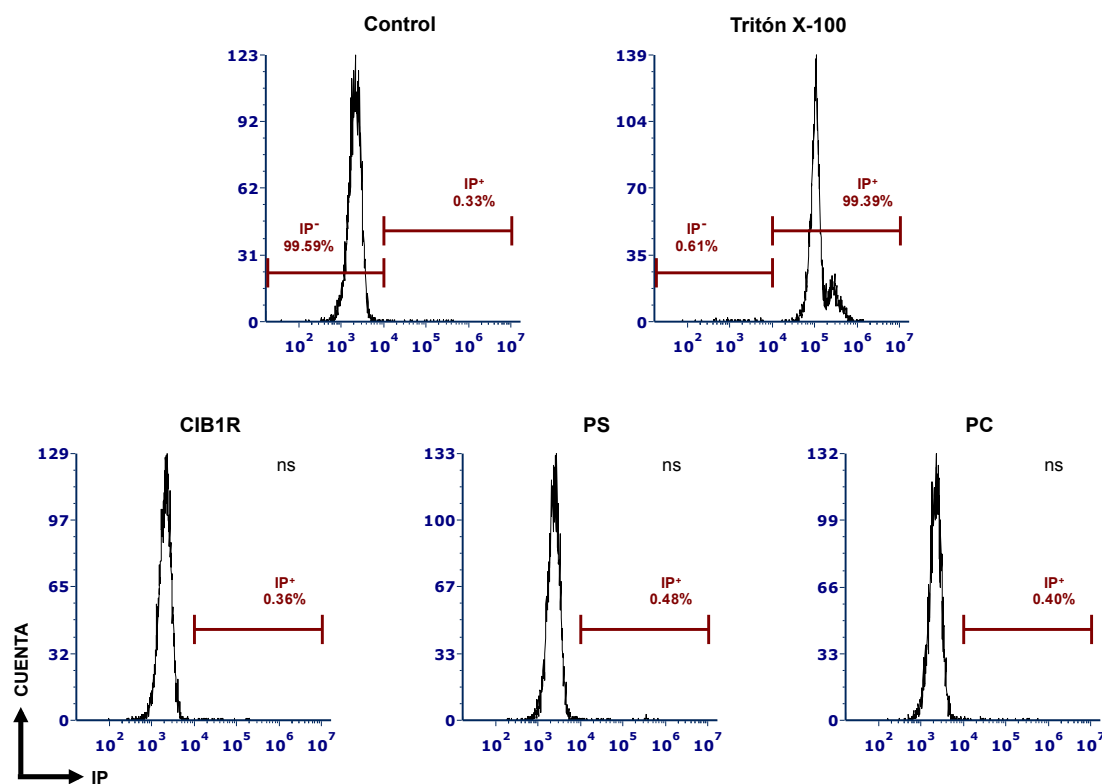


Figura 22. Histogramas representativos de la captura de IP. Las células tratadas con los péptidos CIB1R, PS y PC no ejercieron un efecto en la permeabilidad de membrana.

Los resultados anteriormente expuestos demuestran que la membrana de las células de cáncer de pulmón no se ven afectadas cuando se exponen a las 4 secuencias peptídicas previamente mencionadas. La permeabilidad de las membranas se mantiene intacta como la del control, el cual fue incubado con medio de cultivo suplementado.

Por cada muestra se analizaron 10,000 eventos y los datos obtenidos del citómetro de flujo Accuri C6 fueron analizados en el software De Novo – FCS Express Flow Cytometry Data Analysis para su interpretación por medio de histogramas.

Para observar si la captación de las 3 secuencias peptídicas se debía a un proceso de internalización directa o mediado por energía, se procedió a evaluar por citometría de flujo la captura ante 2 condiciones de inhibición metabólica: incubación a 4 °C y con azida de sodio 10 mM, un inhibidor de la producción de ATP.

7.9 Captura peptídica con inhibidores metabólicos

Se inhibió la actividad metabólica de las células para observar si la captación de los péptidos en las células A-549 se debía a un proceso de internalización directa o mediante una vía de endocitosis. Para ello se compararon los porcentajes de la población celular positiva para FITC cuando fueron incubadas a 4 °C, 37 °C y con azida de sodio 10 mM.

En la figura 23 se muestran los histogramas representativos de la inhibición de la captación de cada uno de los péptidos marcados con FITC. Se observó que la población celular incubada a 4 °C y con azida de sodio 10 mM mantiene su localización en el eje de las abscisas (X) al mismo rango que el control. Esto es indicativo de una nula internalización de los péptidos.

Cuando las células se incubaron a la temperatura de 4 °C, la captación de los péptidos CIB1R y PS se presentó en menos del 1% de la población celular analizada. Así mismo, la cantidad de células que presentaron internalización del péptido PC fue del 2%. Considerando como un 100% la captación de cada uno de los 3 péptidos a 37 °C, CIB1R y PS presentaron una inhibición en su captura en más de un 99% y PC en un 97%.

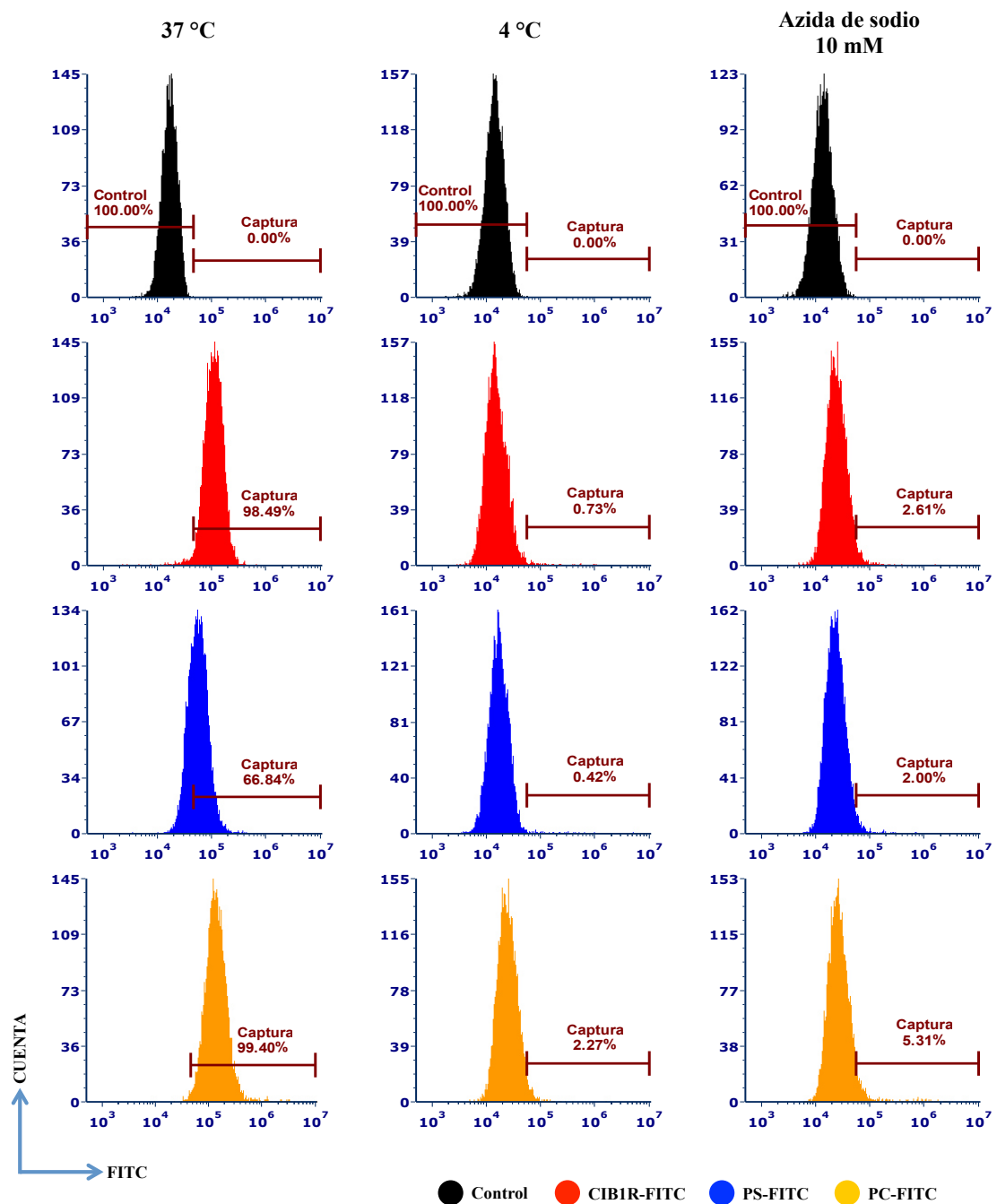


Figura 23. Inhibición de la captación de CIB1R, PS y PC en las células A-549. La internalización peptídica fue inhibida a 4°C y por disminución del ATP celular. Las células de cáncer de pulmón fueron incubadas a 37 °C o 4 °C durante 1 h en presencia de 306 µM de cada uno de los péptidos marcados con FITC. Se procedió a analizar mediante citometría de flujo el porcentaje de la población celular positiva para el fluorocromo en el canal FL1.

La captación peptídica se vio afectada igualmente en las células tratadas con azida de sodio 10 mM. Los péptidos CIB1R y PS internalizaron solamente en el 2% de las células analizadas. El péptido PC logró internalizar en mayor grado, en un 5%. Sin embargo, este porcentaje es 18 veces más bajo que lo registrado a 37 °C. Lo cual indica que la captación peptídica en las células de cáncer de pulmón A-549 se efectúa principalmente mediante un proceso dependiente de energía.

8. DISCUSIÓN

En la presente tesis se evaluó el efecto de la inhibición de la migración celular del péptido CIB1R con el objetivo de identificar si es capaz de inducir un bloqueo de este proceso, ya que su secuencia deriva de la región básica del dominio citoplasmático de Neprilisina que se encarga de modular la migración mediante diferentes vías de señalización (Sumitomo et al. 2000, 2004). Para comparar su efecto, se evaluó a la par el péptido PC, el cual posee la secuencia completa del dominio citoplasmático de NEP y si es capaz de internalizar completamente en la célula debe regular el proceso de migración e invasión.

Nuestro estudio demuestra la capacidad de los péptidos CIB1R y PC de internalizar en las células A-549 de cáncer de pulmón a una dosis de 306 μ M, presentando una distribución homogénea en el interior de la célula como se muestra en figura 21, lo cual permite a cada péptido ejercer una función biológica a nivel citoplasmático y/o nuclear.

El mecanismo exacto por el cual los péptidos internalizan en las células aún no es completamente elucidado. Actualmente se sabe que la interacción electroestática entre los péptidos catiónicos y proteoglicanos de la superficie celular está involucrada en la etapa temprana del proceso de internalización celular (Eiriksdottir et al. 2010; Madani et al. 2011; Figueiredo et al. 2014). Esta interacción induce la activación de vías de señalización intracelular que promueven la remodelación de la actina, favoreciendo la captación a través de diferentes rutas de internalización (translocación directa y endocitosis) (Benavent-Acero et al. 2014).

Considerando la mínima captación peptídica registrada en las células A-549 al ser expuestas a dos condiciones de inhibición metabólica (figura 23), se puede sugerir que la posible vía de captación de los péptidos CIB1R, PS y PC es mediante endocitosis o regulada por unión a un receptor de membrana. Así mismo, la posibilidad de internalización mediante difusión pasiva (independiente de energía) es descartada al no existir una captación del péptido por las células tratadas con azida de sodio, un inhibidor

de la producción de ATP al bloquear la fosforilación oxidativa (Schwoebel et al. 2002; Cheng et al. 2014; Copolovici et al. 2014). Siendo lo anterior confirmado por un segundo ensayo, en donde las células se incubaron a 4 °C y la captación fue nula. Lo cual confirma la ausencia de un mecanismo de internalización por una vía no endocítica.

Lo anteriormente expuesto, es confirmado con los resultados obtenidos en el ensayo de captación de IP (figura 22). Al no existir una alteración en la permeabilidad de la membrana, se descarta la captación mediante poros transitorios. Previamente se ha reportado que este mecanismo de internalización provoca cambios en la estructura de la bicapa lipídica, perturbándola significativamente (Raucher y Ryu 2015; Kristensen et al. 2016).

Algunos reportes indican que los péptidos cargados positivamente son capaces de escapar de los endosomas hacia el citoplasma cuando son internalizados mediante endocitosis o de penetrar directamente por la membrana plasmática cuando se encuentran como mínimo a una concentración de 10 μ M (Duchardt et al. 2007; Copolovici et al. 2014; Skotland et al. 2015). Esto explicaría la alta cantidad y homogénea distribución de los péptidos en el citoplasma de las células (figuras 19 y 21), ya que las 3 secuencias peptídicas son de naturaleza altamente catiónica (tabla 1) y fueron administradas a una concentración mayor de 10 μ M.

Previamente se ha reportado la pérdida de la expresión de la proteína Neprilisina en cáncer de pulmón de células no pequeñas y en la línea celular A-549, así como en cáncer próstata y mama, lo cual está asociado con una rápida progresión neoplásica (Ganju et al. 1994; Myong 2002; Leithner et al. 2014). La gran mayoría de los reportes a la fecha sólo evalúan la relación entre el nivel de expresión de la proteína, el grado de diferenciación de las células tumorales en muestras clínicas y la presencia de metástasis con la sobrevivencia de los pacientes (Huang et al. 2005; Kim et al. 2010; Gürel et al. 2012; Franhauser et al. 2015).

Actualmente, sólo se ha evaluado el efecto de la sobreexpresión de Neprilisina en diversos modelos de cáncer para demostrar su papel en la regulación de la migración celular, sin embargo a la fecha no existe un reporte que mencione el uso de péptidos derivados del dominio citoplasmático de la proteína que ejerzan una modulación en la invasividad de las células de cáncer.

En este trabajo se demostró la capacidad del péptido CIB1R para regular la migración e invasión celular *in vitro*, inhibiendo cada una de ellas en más del 50% sin afectar la proliferación celular a las 24 h. Un efecto muy similar fue observado para el péptido CTT, el cual se ha demostrado que inhibe la migración en más de un 80% en diversas líneas de cáncer, entre ellas, células de fibrosarcoma HT1080, melanoma C8161, carcinoma de ovario SKOV-3, MCF-7 y sarcoma de Kaposi KS1767 sin modificar su viabilidad celular a una dosis de 500 μ M (Koivunen et al. 1999; Huang et al. 2013). Este fenómeno se ha reportado de igual forma en el péptido GPI, derivado de la alfa-fetoproteína humana, el cual posee la capacidad de modular la migración en un 33% y en un 67% la invasión de células de cáncer de tiroides. Así mismo, se ha demostrado que GPI no es capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales después de 96 h de tratamiento (Hua et al. 2010). Lo anterior demuestra la capacidad de ciertas secuencias peptídicas de presentar un efecto específico para el proceso de migración e invasión celular.

En estudios anteriores han evaluado el efecto de la proteína Neprilisina en la migración celular implementando diversos modelos de cáncer. Mediante la inducción de la expresión de la proteína NEP mutada para depletar su actividad catalítica en un modelo de cáncer de próstata, se ha demostrado que el dominio citoplasmático de NEP es capaz de regular la migración en un 54% en células de cáncer de próstata PC3 (Sumitomo et al. 2000). Esto es particularmente similar a la presente investigación, en donde el efecto registrado por el péptido PC en la inhibición de la motilidad de las células A-549 fue del 59% y en un 50% por el péptido CIB1R, ambos a la misma dosis. Lo anterior demuestra el potencial de la región básica del dominio citoplasmático de NEP para modular la migración en células de cáncer de pulmón.

Otros estudios han reportado la reducción de la migración en la línea celular SKOV3 de cáncer de ovario en un 62% mediante la inducción de la sobreexpresión de la proteína Neprilisina (Kajiyama et al. 2005). Este incremento del porcentaje de inhibición lo atribuyen al efecto en conjunto que presentan el dominio citoplasmático y el dominio extracelular, el cual degrada factores como ET-1 que activan las vías de señalización relacionadas a FAK (Maguer-Satta et al. 2011; Rosano et al. 2013). Otros investigadores tales como, Stephen et al. demostraron el restablecimiento del control de la migración celular cuando indujeron la expresión de la proteína Neprilisina en modelos *in vitro* de cáncer de mama, en los cuales la migración e invasión de las células MCF-7 y MDA-MB-231 disminuyeron en un 50% (Stephen et al. 2016). Lo anterior demuestra que NEP funge como un regulador negativo de invasividad del cáncer de mama.

La principal diferencia registrada entre los estudios anteriormente citados y el presente trabajo, es que al inducir la expresión de la proteína ya sea mutada, para bloquear su actividad catalítica, o íntegra, la función del dominio citoplasmático en ningún momento se ve comprometido para ejercer su efecto. En comparación, el péptido CIB1R para ejercer su efecto tiene que evadir ciertas dificultades, como es la degradación por proteasas tanto del espacio extracelular como del interior de la células. Aunado a ello, el péptido debe ser capaz de internalizarse en la célula a una alta concentración para ejercer un efecto significativo en la migración celular. A pesar de todo lo anterior, se demostró que el péptido CIB1R logró inhibir la migración e invasión celular en un modelo de cáncer de pulmón en un porcentaje muy similar a los ya reportados por otros grupos de investigación quienes trabajaron con la proteína completa (Shipp et al. 1991; Cohen et al. 1996; Bunn et al. 1998).

Se ha reportado que la invasividad celular es otro mecanismo que regula NEP mediante la interacción de la región anfipática del dominio citoplasmático (figura 6) con el dominio FERM en el extremo amino terminal de la proteína Radixina (Iwase et al. 2004; Terawaki et al. 2006). Radixina forma un complejo llamado ERM (Ezrina/Radixina/Meosina) que actúa como molécula de unión entre los filamentos de actina del citoesqueleto de las células con los dominios intracelulares de las proteínas

transmembranales, tales como CD44, CD43 e ICAM1-3, los cuales se unen al dominio FERM para inducir cambios en la adhesión, motilidad y morfogénesis (Tsukita et al. 1999; Sun et al 2002). En nuestros resultados se observó que el péptido PC fue la secuencia que indujo una mayor inhibición de la migración e invasión celular de la línea A-549 de cáncer de pulmón (figura 15 y 17), lo cual fue estadísticamente significativo en ambos casos con una $p < 0.001$. Este efecto fue en menor grado modulado por los péptidos CIB1R y PS, debido a la carencia de la región hidrofóbica dentro de su secuencia. En comparación a CIB1R y PS, el péptido PC puede competir por el sitio de unión a ERM, disminuyendo la interacción entre el dominio FERM de radixin y las proteínas CD44 e ICAM1-3. En contraste a Neprilisina, CD44 puede promover la migración celular y la invasividad mediante su unión a ERM.

Así mismo, considerando lo reportado por Terawaki et al. en su estudio, el posible mecanismo por el cual los péptidos CIB1R, PS y PC inhibieron la migración e invasión celular se basa en la interacción directa entre los residuos básicos (lisinas) que conforman las secuencias peptídicas con las moléculas de PIP2 cargadas negativamente, lo cual se ha propuesto anteriormente con la molécula ICAM-2 (Heiska et al. 1998; Hamada et al. 2003; Terawaki et al. 2007). Así mismo, mediante una asociación directa con el supresor tumoral PTEN a través de interacciones electrostáticas entre las lisinas de los péptidos CIB1R y PS y región básica de PC con el extremo carboxilo terminal fosforilado de PTEN (Sumitomo et al. 2004).

Por lo anterior, es importante caracterizar completamente las propiedades del péptido CIB1R en cáncer y células sanas, su mecanismo de captura y vía de señalización para elucidar si efectivamente la inhibición de la migración e invasión celular ejercida en las células A-549 de cáncer de pulmón es mediante las rutas anteriormente expuestas, las cuales son propuestas en base a los estudios efectuados con el dominio citoplasmático de la proteína Neprilisina. De igual forma demostrar si el péptido CIB1R es capaz de modular la migración de células HUVEC para demostrar si posee el efecto de inhibir la vascularización del tumor. Interesantemente las células endoteliales del estroma han presentado una alteración en la expresión de la proteína NEP (Makretsov et al. 2007;

Kuruppu et al. 2014; Tariq et al. 2015), lo cual favorece el grado de formación de nuevos vasos sanguíneos hacia el tumor y propagación de las células tumorales (metástasis).

Por otra parte, en la actualidad existen secuencias aminoacídicas conocidas como péptidos de penetración celular (CPPs), los cuales poseen una secuencia entre 5-30 amino ácidos, y en la mayoría de los casos presentan una carga neta positiva (Reissmann et al. 2014; Raucher et al. 2015). Las características principales de este tipo de péptidos son su capacidad de cruzar membranas celulares mediante diversos mecanismos, comúnmente endocitosis, y su habilidad para facilitar la liberación intracelular de conjugados bioactivos con un bajo nivel de toxicidad (Thundimadathil 2012; Copolovici et al. 2014; Feng y Tang 2015; Guidotti et al. 2017). Teniendo en cuenta que el péptido CIB1R posee un alto grado de internalización en las células en un lapso corto sin afectar la viabilidad celular, se puede proponer como un innovador CPP acarreador de siRNA, plásmidos y diversas moléculas de interés farmacológico.

Este trabajo contribuye en cierto grado con el esclarecimiento del efecto que presentan los líquidos ascíticos sobre diversos modelos de cáncer, en donde se ha demostrado que pueden ejercer un impacto antitumoral mediante la inhibición de la migración e invasión celular, inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular y control de la angiogénesis (Jandu et al. 2006; Meunier et al. 2010; Cohen et al. 2014). Así mismo se abre el camino a la evaluación de otros péptidos presentes en ascitis o efusión pleural que deriven de sitios activos de proteínas con actividad antitumoral.

9. CONCLUSIONES

Se demostró que el péptido CIB1R inhibe el proceso de migración celular dependiente de dosis en la línea de cáncer de pulmón A-549, sin afectar su proliferación celular.

La invasión y adhesión de las células A-549 se vio disminuida con los péptidos CIB1R, PS, PC y CTT.

La inhibición de la migración e invasión celular no fue dependiente de secuencia y estructura.

Las 3 secuencias peptídicas en estudio son internalizadas por las células A-549, teniendo presencia homogénea en citoplasma y núcleo sin afectar la permeabilidad de la membrana celular.

La captura peptídica es efectuada mediante alguna vía de endocitosis y/o regulada mediante unión a un receptor de membrana.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar estudios que nos permitan identificar cual es la vía de señalización que sigue el péptido CIB1R y compararla con los péptidos PS y PC. Para ello sería necesario realizar ensayos de inmunoprecipitación para identificar moléculas de interacción, Western-blot para evaluar los niveles de fosforilación de proteínas involucradas en la migración celular, como FAK y PTEN. Determinar si el péptido es capaz de interaccionar con PIP2.

Demostrar si el péptido interacciona con alguna proteína nuclear o con el material genético al llegar al núcleo y el efecto que ejerza sobre la migración celular.

Así mismo, poder identificar el mecanismo por el cual el péptido es internalizado hacia el citoplasma.

Analizar la estabilidad del péptido en suero humano, mediante análisis de espectrometría de masas.

Demostrar el efecto *in vitro* e *in vivo* en otros modelos de cáncer.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed N, Stenvers K. 2013. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in oncology* 3: 256.
2. Amini S, Byers LA, Welsh JW, Komaki RU. 2014. Progress in the management of limited-stage small cell lung cancer. *Cancer* 120: 790-8.
3. Ammouri L, Prommer E. 2010. Palliative treatment of malignant ascites: profile of catumaxomab. *Biolog Targ Ther* 4: 103-110.
4. Arrieta O, Gúzman AE, Alba-López LF. 2013. National consensus of diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer. *Rev Inves Clin* 65: 5-84.
5. Benavent-Acero FR, Perera-Negrin Y, Alonso DF, Perea SE, Gomez DE, Farina HG. 2014. Mechanisms of celular uptake, intracelular transportation, and degradation of CIGB-300, a Tat-conjugated peptide, in tumor cell lines. *Mol Pharm* 11: 1798-807.
6. Berlose JP, Convert O, Derossi D, Brunissen A, Chassaing G. 1996. Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur J Biochem* 242: 372-386.
7. Bian D, Su S, Mahanivong C. 2004. Lysophosphatidic acid stimulates ovarian cancer migration via a Ras-MEK kinase 1 pathway. *Cancer Res* 64: 4209–17.
8. Bilalovic N, Sandstad B, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Torlakovic EE. 2004. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod Pathol* 17: 1251–1258.
9. Bunn PA Jr, Helfrich BA, Brenner DG, Chan DC, Dykes DJ, Cohen AJ, Miller YE. 1998. Effects of recombinant neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) on the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 4: 2889-2858.
10. Carpenter TC, Stenmark KR. 2001. Hypoxia decreases lung neprilysin expression and increases pulmonary vascular leak. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L941-L948.
11. Cavazzoni E, Bugiantella W, Graziosi L, Franceschini MS, Donini A. 2013. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *Int J Clin Oncol* 18: 1-9.

- 12.**Cheng L, Huang FZ, Cheng LF, Zhu YQ, Hu Q, Li L, Wei L, Chen DW. 2002. GE11-modified liposomes for non-small cell lung cancer targeting: preparation, *ex vitro* and *in vivo* evaluation. *Int J Nanomedicine* 9: 921-935.
- 13.**Choi SH, Lee JY, Suh JS, Park YS, Chung CP, Park YJ. 2016. Dual-function synthetic peptide derived from BMP4 for highly efficient tumor targeting and antiangiogenesis. *Int J Nanomedicine* 13: 4643-4656.
- 14.**Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W, Magil-Solc C, Hartmann C, Helfrich B, Gilman L, Forkvord J, Helm K, Miller YE. 1996. Neutral endopeptidase: variable expression in human lung, inactivation in lung cancer, and modulation of peptide-induced calcium flux. *Cancer Res* 56: 831-839.
- 15.**Cohen M, Pierredon S, Wullemmin C, Delie F, Petignat P. 2014. Acellular fraction of ovarian cancer ascites induce apoptosis by activating JNK and inducing BRCA1, Fas and FasL expression in ovarian cancer cells. *Oscoscience* 1: 262-270.
- 16.**Copolovici D.M, Langel K, Eriste E, Langel U. 2014. Cell-penetrating peptides: Design, synthesis, and applications. *ACS Nano* 8: 1972–1994.
- 17.**Da Costa JP, Carvalhais V, Amado F, Silva A, Nogueira-Ferreira R, Helguero L, Vitorino R. 2015. Anti-tumoral activity of human salivary peptides. *Peptides* 71: 170-178.
- 18.**Dai J, Shen R, Sumitomo M, Goldberg JS, Geng Y, Navarro D, Xu S, Koutcher JA, Garzotto M, Powell CT, Nanus DM. 2001. Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 7: 1370-1377.
- 19.**Dall’Era MA, True LD, Siegel AF, Porter MP, Sherertz TM, Liu AY. 2007. Differential expression of CD10 in prostate cancer and its clinical implication. *BMC Urol* 7: 3.
- 20.**Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. 1996. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*. 271: 18188-18193.
- 21.**Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R. 2007. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8: 848–866.

- 22.** Eiríksdóttir E, Konate K, Langel U, Divita G, Deshayes S. 2010. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim Biophys Acta* 1798: 1119-28.
- 23.** Feng J, Tang L. 2015. The cell-type specificity and endosomal escape of cell-penetrating peptides. *Curr Pharm Des.* 21: 1351-1356.
- 24.** Figueiredo IR, Freire JM, Veiga AS, Castanho M. 2014. Cell-penetrating peptides: a tool for effective delivery in gene-targeted therapies. *IUBMB Life* 66: 182-194.
- 25.** Fleischmann A, Rocha C, Saxer-Sekulic N, Zlobec I, Sauter G, Thalmann GN. 2011. High CD10 expression in lymph node metastases from surgically treated prostate cancer independently predicts early death. *Virchows Archiv* 458: 741–748.
- 26.** Frankhouser CD, Sulser T, Zhong Q, Barghorn A, Moch H, Bode PK. 2015. CD10 expression in 325 testicular germ cell tumours. *Clin Pathol* 68: 400-403.
- 27.** Freedland SJ, Seligson DB, Liu AY, Pantuck AJ, Paik SH, Horvath S, Wieder JA, Zisman A, Nguyen D, Tso CL, Palotie AV, Belldegrun AS. 2003. Loss of CD10 (neutral endopeptidase) is a frequent and early event in human prostate cancer. *Prostate* 55: 71–80.
- 28.** Gallo-Oller G, Vollmann-Zwerenz A, Meléndez B, Rey JA, Hau P, Dotor J, Castresana JS. 2016. P144, a transforming growth factor beta inhibitor peptide, generates antitumoral effects and modifies SMAD7 and SKI levels in human glioblastoma cell lines. *Cancer let* 381: 67-75.
- 29.** Ganju RK, Shpektor RG, Brenner DG, Shipp MA. 1996. CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the lyn src-related kinase. *Blood* 88: 4159-65.
- 30.** Ganju RK, Sunday M, Tsarwhas DG, Card A, Shipp MA. 1994. The expression of CD10/NEP in non small cell lung carcinomas: relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest* 94: 1784-1789.
- 31.** Gayathiri K, Prabhavathi A, Tamilarasi R, Vimalavathini R, Kavimano S. 2014. Role of neprilysin in various diseases. *Int J Pharm Res* 4: 23-28.

- 32.**Göhring B, Holzhausen HJ, Meye A, Heyneman H, Rebmann U, Langner J, Riemann D. 1998. Endopeptidase 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med* 2: 409-414.
- 33.**Goncharenko-Khaider N, Matte I, Lane D, Rancourt C, Piché A. 2012. Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer* 11: 84.
- 34.**Goodman O, Febbraro M, Simantov R, Zheng R, Shen R, Silverstein R, Nanus DM. 2006. Neprilysin inhibits angiogenesis via proteolysis of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 281: 33597-33605.
- 35.**Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. 2017. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinic. *Trends Pharmacol Sci* doi: 10.1016/j.tips.2017.01.003.
- 36.**Guo Z, Peng H, Kang J, Sun D. 2016. Cell-penetrating peptides: possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed Rep* 4: 528-534.
- 37.**Gürel D, Kargi A, Karaman I, Önen A, Ünlü M. 2011. CD10 expresión in epithelial and stromal cells of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): a clinic and pathologic correlation. *Pathol Oncol Res* 18: 153-160.
- 38.**Hamada K, Shimizu T, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T. 2003. Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J* 22: 502-514.
- 39.**Hatton M, Southward S, Legault K. 2004. Fibrinogen catabolism within the procoagulant VX2 tumor of rabbit lung in vivo: effluxing fibrin(ogen) fragments contain antiangiogenic activity. *J Lab Clin Med* 143: 241-254.
- 40.**Hatton M, Southward S, Ross BL. 2002. Angiostatin II is the predominant glycoform in pleural effusates of rabbit VX2 lung tumors. *J Lab Clin Med* 139: 316-323.
- 41.**Heiska L, Alftan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O. 1998. Association of Ezrin with Intercellular Adhesion Molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). *J Biol Chem* 273: 21893-21900.
- 42.**Hua S, Chen S, Lu C, Kao Y, Yu H, Chen P, Lee Y, Chang T. 2010. The effects of growth inhibitory peptide on follicular thyroid cancer cell growth, migration and invasion. *Tumori* 96: 448-451.

- 43.** Huang R, Long J, Zhang H, Zhang Y. 2013. The synthetic peptide RGDSY-CTTHWGFTLC inhibits metastasis and proliferation of breast cancer cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33: 1367-1371.
- 44.** Huang WB, Zhou XJ, Chen JY, Zhang LH, Meng K, Ma HH, Lu ZF. 2005. CD10-positive stromal cells in gastric carcinoma: correlation with invasion and metastasis. *Jpn J Clin Oncol* 35: 245-250.
- 45.** Imai K, Kanzaki H, Fujiwar H, Kariya M, Okamoto N, Takakura K, Maeda M, Mori T. 1992. Expression of aminopeptidase N and neutral endopeptidase on the endometrial stromal cells in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 7: 1326-1328.
- 46.** Iwase A, Shen R, Navarro D, Nanus DM. 2004. Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to Ezrin/Radixin/Meosin (ERM) preotein competes with the interaction of CD44 with ERM proteins. *J Biol Chem* 279: 11898-118905.
- 47.** Jandu N, Richardson, Singh G, Hirte H, Hatton M. 2006. Human ovarian cancer ascites fluid contains a mixture of incompletely degraded soluble products of fibrin that collectively possess an antiangiogenic property. *Int J Gynecol Cancer* 16: 1536-1544.
- 48.** Jang TJ, Park JB, Lee JI. 2013. The expression of CD10 and CD15 is progressively increased during colorectal cancer development. *Korean J Pathol* 47: 340–347.
- 49.** Jeanne A, Sick E, Devy J, Floquet N, Belloy N, Theret L, Boulagnon-Rombi C, Diebold MD, Dauchez M, Martiny L, Schneider C, Dedieu S. 2015. Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent. *Oncotarget* 6: 17981-18000.
- 50.** Jones AT. 2007. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 11: 670–684.
- 51.** Kajiyama H, Kikkawa F, Maeda O. 2002. Increased expression of dipeptidyl peptidase IV in human mesothelial cells by malignant ascites from ovarian carcinoma patients. *Oncology* 63: 158–65.

- 52.** Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Morita T, Ino K, Mizutani S, Kikkawa F. 2005. Neutral endopeptidase 24.11/CD10 suppresses progressive potential in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 11: 1798–1808.
- 53.** Kanitakis J, Narvaez D, Claudy A. 2002. Differential expression of the CD10 antigen (neutral endopeptidase) in primary versus metastatic malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 12: 241–244.
- 54.** Kawabata A, Matsuzuka T, Doi C, Seiler G, Reischman J, Pickel L, Ayuzawa R, Nguyen TA, Tamura M. 2012. C1B domain peptide of protein kinase C γ significantly suppresses growth of human colon cancer cells in vitro and in vivo mouse xenograft model through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Biol Ther* 13: 880-889.
- 55.** Kim HS, Kim GY, Kim YW, Park YK, Song JY, Lim SJ. 2010. Stromal CD10 expression and relationship to the E-cadherin/beta-catenin complex in breast carcinoma. *Histopathology* 56: 708-719.
- 56.** Kipps E, Tan D, Kaye S. 2013. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* 13: 273-282.
- 57.** Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkilä P, Kantor C, Gahmberg CG, Salo T, Kontinen YT, Sorsa T, Ruoslahti E. 1999. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol* 17: 768-774.
- 58.** Kosanam H, Makawita S, Judd B, Newman A, Diamandis E. 2011. Miming the malignant ascites proteome for pancreatic cancer biomarkers. *Proteomics* 11: 4551-4558.
- 59.** Kristensen M, Birch D, Nielsen HM. 2016. Applications and challenges for use of cell-penetrating peptides as delivery vectors for peptide and protein cargos. *Int J Mol Sci* 17: 185-202.
- 60.** Kristiansen G, Schlüns K, Yongwei Y, Dietel M, Petersen I. 2002. CD10 expression in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 24: 41-46.
- 61.** Kuniyasu H, Luo YL, Tasahari T, Moriwaka Y, Tatsumoto N, Sasaki T, Yamashita Y, Ohmori H. 2010. CD10 enhances metastasis of colorectal cancer by abrogating the anti-tumoral effect of methionine-enkephalin in the liver. *Gut* 59: 348-356.

62. Kuroda Y, Kato-Kogoe, Tasaki E, Yuasa-Sunagawa M, Yamanegi K, Nakasyo K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y. 2015. Suppressive effect of membrane-permeable peptides derived from autophosphorylation sites of the IGF-1 receptor on breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 765: 24-33.
63. Lane D, Goncharenko-Khaider N, Rancourt C, Piché A. 2010. Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through $\alpha\beta 5$ integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation. *Oncogene* 29: 3519–3531.
64. Lane D, Robert V, Grondin R, Rancourt C, Piché A. 2007. Malignant ascites protect against TRAIL-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 121: 1227–1237.
65. Leithner K, Wohlkoeig C, Stacher E, Lindenmann J, Hofmann NA, Gallé B, Guelly C, Quehenberger F, Stiegler P, Smolle-Jüttner DM, Philipsen S, Popper HH, Hrzenjak A, Olschewski A, Olschewski H. 2014. Hypoxia increases membrane metallo-endopeptidase expression in a novel lung cancer *ex vivo* model – role of tumor stroma cells. *BMC Cancer* 14: 40.
66. Li X, Liu Y, Haas TA. 2014. Peptides derived from central turn motifs within integrin $\alpha_{IIb} \gamma$ α_V cytoplasmic tail inhibit integrin activation. *Peptides* 62: 38-48.
67. Liao S, Liu J, Lin P, Shi T, Jain RK, Xu L. 2011. TGF-beta blockade controls ascites by preventing abnormalization of lymphatic vessels in orthotopic human ovarian carcinoma models. *Clin Cancer Res* 17: 1415-1424.
68. Lundberg P, Langel U. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* 16: 227-233.
69. Madani F, Lindberg S, Langel Ü, Futaki S, Gräslund A. 2011. Mechanism of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 211: 414729.
70. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E. 2011. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells* 29: 389–396.
71. Makretsov NA, Hayes M, Carter BA, Dabiri S, Gilks CB, Huntsman DG. 2007. Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Mod Pathol* 20: 84-89.

- 72.** Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP, Schwartz JC. 1978. High affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276: 523-6.
- 73.** Marie-Claire C, Tiraboschi G, Ruffet E, Inguibert N, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. 2000. Exploration of the S'1 subsite of neprilysin: A joined molecular modeling and site-directed mutagenesis study. *Proteins* 39: 365-371.
- 74.** Mathers CD, Loncar D. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3: 442-448.
- 75.** Matsumoto K, Nakamura T. 2006. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions. *Int J Cancer* 119: 477–83.
- 76.** Matte I, Lane D, Bachvarov D. 2014. Role of malignant ascites on human peritoneal mesothelial cells and their gene expression profiles. *BMC Cancer* 14: 288.
- 77.** Matte I, Lane D, Laplante C, Garde-Granger P, Rancourt C, Piché A. 2015. Ovarian cancer ascites enhance the migration of patient-derived peritoneal metothelial cells via cMet pathway through HGF-dependent and –independent mechanisms. *Int J Cancer* 137: 289-98.
- 78.** Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piche A. 2012. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J cancer Res* 2: 566-580.
- 79.** Metzgar S, Borowitz J, Jones H, Dowell L. 1981. Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp Med* 154: 1249-54.
- 80.** Meunier L, Puiffe M, Le Page C, Filali-Mouhim A, Chevrette M, Tonin P, Provencher D, Mes-Masson A. 2010. Effect of ovarian cancer ascites on cell migration and gene expression in a epithelial ovarian cancer *in vitro* model. *Transl Oncol* 3: 230-238.
- 81.** Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Szubert S, Moszynski R, Szpurek D, Sajdak S, Tykarski A, Ksiazek K. 2016. Biochemical composition of malignant ascites determines high aggressiveness of undifferentiated ovarian tumors. *Med Oncol* 33: 94-101.

- 82.** Mitra R, Chao OS, Nanus DM, Goodman OB. 2013. Negative regulation of NEP expression by hypoxia. *Prostate* 73: 706-714.
- 83.** Mizerska-Kowalska M, Bojarska-Junak A, Jakubowicz-Gil J, Kandefer-Szerszén M. 2016. Neutral endopeptidase (NEP) is differentially involved in biological activities and cell signaling of colon cancer cell lines derived from various stages of tumor development. *Tumor Biol* 37: 13355-13368.
- 84.** Mokhtari M, Ameri F. 2014. Diagnostic value of CD-10 marker in differentiating of papillary thyroid carcinoma from benign thyroid lesions. *Adv Biomed Res* 3: 206-212.
- 85.** Myong N. 2002. Loss of CD10/NEP expression in the pulmonary carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 34: 17-22.
- 86.** Nanus DM. 2003. Of Peptides and Peptidases: The Role of Cell Surface Peptidases in Cancer. *Clin Cancer Res* 9: 6307-6309.
- 87.** Oba J, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Liu M, Abe T, Hagihara A, Yokomizo T, Furue M. 2016. CD10-equipped melanoma cells acquire highly potent tumorigenic activity: a plausible explanation of their significance for a poor prognosis. *PLoS ONE* 11: e 0149285.
- 88.** Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, Winkler FK, Dale GE. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 296: 341-349.
- 89.** Okumura K, Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, Shibata T, Hirata M, Isogai H. 2004. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett* 212: 185-194.
- 90.** Osman I, Dai J, Mikhall M, Navarro D, Taneja S, Lee P, Christos P, Shen R, Nanus DM. 2006. Loss of neutral endopeptidase and activation of protein kinase b (AKT) is associated with prostate cancer progression. *Cancer* 107: 2628-2636.
- 91.** Osman I, Yee H, Taneja S, Levinson B, Zeleniuch-Jacquotte A, Chang C, Nobert C, Nanus DM. 2004. Neutral endopeptidase protein expression and prognosis in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10: 4096–4100.

- 92.** Palacios-Corona R, Ortíz-Navarrete VF, Said-Fernández S, Rodríguez-Padilla C, Gonzaález-Garza MT. 1999. Detection of a factor released by L5178Y lymphoblasts that inhibits mouse macrophage-activation induced by lipopolysaccharides. *Arch Med Res* 30: 298-302.
- 93.** Palacios-Corona R, Vargas-Villarreal J, Gutiérrez-Hermosillo H, Cruz-Ramos M, Espino-Ojeda A, Gómez-Rueda H, Monsivais-Díaz O, Díaz de León-Gonzalez, Martínez-Armenta CA. 2017. Partial characterization of immunosuppressive activity of ascites and pleural effusion from patients with primary neoplasias. *FlatScience* 1: 1-5.
- 94.** Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM. 1998. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med* 4: 50–57.
- 95.** Peng P, Yan Y, Keng S. 2011. Exosomes in the ascites malignant of cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity. *Oncol Rep* 25: 749-762.
- 96.** Penson RT, Kronish K, Duan Z, Feller AJ, Stark P, Cook SE. 2000. Cytokines IL-1beta, IL-12, IL-6, IL-8, MPC-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer* 10: 33-41.
- 97.** Petersen I, Warth A. 2016. Lung cancer: developments, concepts, and specific aspects of the new WHO classification. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 895-904.
- 98.** Pinto da Costa J, Carvalhais V, Amado F, Silva A, Nogueira-Ferreira R, Ferreira R, Helguero L, Vitorino R. 2015. Anti-tumoral activity of human salivary peptides. *Peptides* 71: 170-178.
- 99.** Puiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin P, Chevrete M, Provencher D, Mes-Masson AM. 2007. Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian. *Neoplasia* 9: 820-829.
- 100.** Raucher D, Ryu JS. 2015. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. *Trends Mol Med* 21: 560-570.

- 101.** Reissmann S. 2014. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J Pept Sci* 20: 760-784.
- 102.** Richardson M, Gunawan J, Hatton M, Seidlitz E, Hirte H, Singh G. 2002. Malignant Ascites Fluid (MAF), including ovarian-cancer-associated MAF, contains angiostatin and other factor(s) which inhibit angiogenesis. *Gynecol Oncol* 86: 279-287.
- 103.** Rosano L, Spinella F, Bagnato A. 2013. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 13: 637–651.
- 104.** Rotenberg R, Rozas N, Guerri L, Cher M, Gamboni M, Lema N, Bonfil D. 2004. Elevated levels of angiostatina in effusions from patients with malignant disease. *Oncol Rep* 11: 523-528.
- 105.** Ruchalski K, Gutierrez A, Genshaft S, Abtin F, Suh R. 2016. The evidence for low-dose CT screening of lung cancer. *Clin Imaging* 40: 288-95.
- 106.** Saif M, Siddiqui I, Sohail M. 2009. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Ann Saudi Med* 29: 369-377.
- 107.** Sangisetty SL, Miner TJ. 2012. Malignant ascites: a review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J Gastrointest Surg* 4: 87-95.
- 108.** Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Fujiwara R, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita. 2014. Serum CD10 is associated with liver metastasis in colorectal cancer. *J Surg Res* 192: 390-394.
- 109.** Sato Y, Itoh F, Hinoda Y, Ohe Y, Nakagawa N, Ueda R, Yachi A, Imai K. 1996. Expression of CD10/neutral endopeptidase in normal and malignant tissues of the human stomach and colon. *J Gastroenterol* 31: 12-17.
- 110.** Schwoebel ED, Ho TH, Moore MS. The mechanism of inhibition of Ran-dependent nuclear transport by cellular ATP depletion. *J Cell Biol* 157: 963-974.
- 111.** Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL. 1991. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci* 88: 10662-10666.

- 112.** Skotland T, Geir T, Lyngaas M, Sandvig K. 2015. Cell-penetration peptides: possibilities and challenges for drug delivery *in vitro* and *in vivo*. *Molecules* 20: 13313-133323.
- 113.** Smollich M, Götte M, Yip GW, Yong ES, Kersting C, Fischgräbe J, Radke I, Kiesel L, Wiilfing P. 2007. On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 106: 361-369.
- 114.** Sowter HM, Corps AN, Smith SK. 1999. Hepatocyte growth factor (HGF) in epithelial ovarian tumor fluids stimulates the migration of ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 83: 473–80.
- 115.** Stephen HM, Khoury RJ, Majmudar PR, Blaylock T, Hawkins K, Salama MS, Scott MD, Cosminsky B, Utreja NK, Britt J, Conway RE. 2016. Epigenetic suppression of neprilysin regulates breast cancer invasion. *Oncogenesis* 5: 207.
- 116.** Sumitomo M, Iwase A, Zheng R, Navarro D, Kaminetzky D, Shen R, Georgescu MM, Nanus DM. 2004. Synergy in tumor suppression by direct interaction of neutral endopeptidase with PTEN. *Cancer Cell* 5: 67–78.
- 117.** Sumitomo M, Shen R, Manus DM. 2005. Involment of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim Biophys Acta* 1751: 52-59.
- 118.** Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, Boileau G, Papandreou C, Giancotti F, Knudsen B, Nanus DM. 2000. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 106: 1399-1407.
- 119.** Sun CX, Robb VA, Gutmann DH. 2002. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* 115: 3991-4000.
- 120.** Tariq MU, Haroon S, Kayani N. 2015. Role of CD10 immunohistochemical expression in predicting aggressive behavior of phylloides tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 3147:3152.
- 121.** Taylor KH, Liu J, Guo J, Davis JW, Shi H, Caldwell CW. 2006. Promoter DNA methylation of CD10 in lymphoid malignancies. *Leukemia* 20: 1910–1912.
- 122.** Terauchi M, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Mizutani S, Kikkawa F. 2005. Anti-progressive effect of neutral endopeptidase 24.11 (NEP/CD10) on cervical carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Oncology* 69: 52–62.

- 123.** Terawaki SI, Kitano K, Hakoshima T. 2007. Structural basis for type II membrane protein binding by ERM proteins revealed by the radixin-neutral endopeptidase 24.11 (NEP) complex. *J Biol Chem* 282: 19854-19862.
- 124.** Tokuhara T, Adachi M, Hashida H, Ishida H, Taki T, Higashiyama M, Kodama K, Tachibana S, Sasaki S, Miyake M. 2001. Neutral endopeptidase/CD10 and aminopeptidase N/CD13 gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 49: 489-496.
- 125.** Tomoda C, Kushima R, Takeuti E, Mukaisho KI, Hattori T, Kitano H. 2003. CD10 expression is useful in the diagnosis of follicular carcinoma and follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* 13: 291–295.
- 126.** Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortel-Tieulent J, Jemal A. 2015. Global cancer statistic, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65: 87-108.
- 127.** Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, Pedroso de Lima MC. 2010. Cell-penetrating peptides mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals* 3: 961-993.
- 128.** Tsukita S, Yonemura S. 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (Erzin/radixin/meosin) proteins. *J Biol Chem* 274: 34507-10.
- 129.** Thundimadathil J. 2012. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids* doi:10.1155/2012/967347.
- 130.** Varona A, Blanco L, Perez I, Gil J, Irazusta J, López JI, Candenias ML, Pinto FM, Larrinaga G. 2010. Expresión and activity profiles of DPP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent. *BMC Cancer* 10: 1993.
- 131.** Veronesi G, Bottoni E, Finocchiaro G, Alloisio M. 2015. When is surgery indicated for small-cell lung cancer? *Lung Cancer* 90: 582-9.
- 132.** Vesely DL, Kershaw M, Schreiber R, Smyth M. 2013. Family of peptides synthesized in the human body have anticancer effects. *Anticancer Res* 34: 1456-1466.
- 133.** Wang Y, Niu XL, Qu Y, Wu J, Zhu YQ, Sun WJ. 2010. Autocrine production of IL-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 295: 110-123.

- 134.** Webb TJ, Li X, Giuntoli RL, Lopez PH, Heuser C, Schnaar RI. 2012. Molecular identification of GD3 as a suppressor of innate immune response in ovarian cancer. *Cancer Res* 72: 3744-3752.
- 135.** Wiig H, Swartz M. 2012. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiol Rev* 92: 1005-1060.
- 136.** Xu N, Wang YS, Pan WB, Xiao B, Wen YJ, Chen XC, Chen LJ, Deng HX, You J, Kan B, Fu AF, Li D, Zhao X, Wei YQ. 2008. Human alpha-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. *Mol Cancer Ther* 7: 1588-1597.
- 137.** Yamada T, Sato K, Komachi M. 2004. Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1. *J Biol Chem* 279: 6595–605.
- 138.** Yang W, Toffa SE, Lohn JW, Seifalian AM, Winslet MC. 2005. Malignant ascites increases the antioxidant ability of human ovarian (SKOV-3) and gastric adenocarcinoma (KATO-III) cells. *Gynecol Oncol* 96: 430-438.
- 139.** Yi Z, Cho S, Zhao H, Wu Y, Luo J, Li D, Yi T, Xu X, Wu Z, Liu M. 2009. A novel peptide from human apolipoprotein(a) inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting c-Src phosphorylation in VEGF-induced Human Umbilical Endothelial Cells. *Int J Cancer* 124: 843-852.
- 140.** Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, Akagi Y, Mills GB, Ellis LM. 1999. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol* 6: 372-378.
- 141.** Zheng R, Iwase A, Shen R, Goodman OB, Sugimoto N, Takuwa Y, Lerner DJ, Nanus DM. 2006. Neuropeptide-stimulated cell migration in prostate cancer cells is mediated by RhoA kinase signaling and inhibited by neutral endopeptidase. *Oncogene* 25: 5942-5952.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Carlos Alejandro Martínez Armenta

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: Evaluación del péptido CIB1R, derivado del dominio citoplasmático de Neprilisina, en la migración de las células de cáncer de pulmón A-549.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Guasave, Sinaloa el 12 de agosto de 1991, hijo de Carlos Martinez León y María de Jesús Armenta Rojas.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo con especialidad en Área de Diagnóstico Clínico en 2014.

Experiencia Profesional: Participación en el proyecto de investigación científica “Comparación de la prueba de reducción de MTT y el ensayo con WST-1 para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de plata y oro en células de hígado de Chang” bajo la dirección de la Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera - Universidad Autónoma de Nuevo León (enero – agosto del 2013). Participación en el proyecto de investigación titulado “Caracterización parcial y purificación de la actividad inmunosupresora del líquido de ascitis y pleural de pacientes con neoplasias primarias mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico en células mononucleares de sangre periférica” bajo la dirección de la Dra. Rebeca Palacios Corona del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS (septiembre 2013 – agosto 2014).